N° d'ordre

26

Année scolaire
1952-1953

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

Fernande FAURE
ATTACHÉE DE RECHERCHES
AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

1re Thèse. — NINHYDRINE ET RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS.

2e Thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ : NOTIONS ACTUELLES SUR LA STRUCTURE ET LA SYNTHÈSE DES PÉNICILLINES.

Soutenues le 11 Juillet 1953, devant la Commission d'examen.

Président ..... M. GENEVOIS, professeur.

Juges ..... MM. CALAS, professeur.
ALLARD, professeur.
TAYEAU, professeur à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie.

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1953

d'ordre
26

Année scolaire
1952-1953

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION SCIENCES)

PAR

Fernande FAURE
ATTACHÉE DE RECHERCHES
AU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

1re Thèse. — NINHYDRINE ET RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS.

2e Thèse. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ : NOTIONS ACTUELLES SUR LA STRUCTURE ET LA SYNTHÈSE DES PÉNICILLINES.

Soutenues le 11 juillet 1953, devant la Commission d'examen.

Président ..... M. GENEVOIS, professeur.

Juges ..... MM. CALAS, professeur.
ALLARD, professeur.
TAYEAU, professeur à la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie.

BORDEAUX
IMPRIMERIE E. DROUILLARD
3, PLACE DE LA VICTOIRE, 3

1953

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

MM.

Doyen ..... BRUS

Doyens honoraires..
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur de l'Ecole Normale supérieure.
- CHAINE
- MERCIER

Professeurs honoraires .....
- PADÉ ..... Recteur honoraire de l'Académie d'Aix.
- BOUNHIOL
- DEVAUX ..... Membre de l'Institut.
- DUPONT ..... Directeur de l'Ecole Normale supérieure.
- PICART ..... Membre de l'Institut.
- DAURE ..... Recteur de l'Académie de Caen.
- CHAINE
- KASTLER ..... Professeur à la Sorbonne.
- QUELET ..... Professeur à la Sorbonne.

Professeurs .....
- MERCIER ..... Radio-électricité.
- MILLOUX ..... Calcul infinitésimal.
- DANGEARD ..... Botanique.
- GÉNEVOIS ..... Chimie biologique et Physiologie végétale.
- CAU ..... Physique expérimentale.
- BRUS ..... Chimie.
- AVEL ..... Zoologie et Physiologie animale.
- ROUSSET ..... Physique générale.
- ROGER ..... Mécanique rationnelle.
- WEILL ..... Anatomie comparée et Embryogénie.
- SERVANT ..... Physique.
- DUFRESNOY ..... Mathématiques générales.
- BOUNHIOL ..... Biologie animale.
- PISOT ..... Calcul des probabilités.
- DAVID ..... Biologie végétale.
- GAY ..... Minéralogie.
- SCHOELLER ..... Géologie.
- CALAS ..... Chimie organique.
- ALLARD ..... Chimie.
- GUIZONNIER ..... Physique.
- LAMARE ..... Géologie.
- COLMEZ ..... Mathématiques.
- PATY ..... Chimie.
- PACAULT ..... Chimie minérale et Chimie physique.

Maîtres de conférences honoraires.
- ARRIVAUT
- DE PUYMALY

Maîtres de conférences .....
- MALVESIN-FABRE. Botanique.
- CAMBAR ..... Biologie générale.
- RIBEREAU-GAYON Œnologie et Chimie agricole.
- Mlle JOSIEN ..... Chimie minérale.
- VIGNEAUX ..... Géologie.

Secrétaire principal. ARTIGUELONG

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

NINHYDRINE
ET RÉACTION DE PRÉCIPITATION
ANTIGÈNE-ANTICORPS

INTRODUCTION

Il y a quelque cinquante ans, une étude chimique des phénomènes de l'immunité eût été considérée comme impossible : c'était l'époque où MORGENROTH écrivait : « aucun pont ne relie la chimie à l'immunité ».

Lorsque l'on s'aperçut que les agents agressifs des maladies infectieuses devaient leur toxicité à des substances chimiques, on comprit tout de suite que l'aspect des phénomènes immunitaires ne serait renouvelé qu'avec l'aide de la chimie. De nombreuses recherches furent alors entreprises; elles conduisirent à des résultats tellement intéressants que leur ensemble forme aujourd'hui une science nettement individualisée, *l'immunochimie.*

Notre formation chimique, puis bactériologique nous avait montré tout l'intérêt de cette nouvelle science. Aussi, lorsque nous avons désiré entreprendre des recherches dans ce domaine, nous nous sommes adressée à M. le Professeur TAYEAU qui, au Laboratoire de Biochimie de la Faculté de Médecine de Bordeaux, effectue depuis plusieurs années des recherches immunologiques. Nous avons trouvé tout de suite auprès de ce Maître l'accueil le plus compréhensif et le plus bienveillant; dès le début, M. TAYEAU nous associa à ses recherches et nous proposa d'étudier l'action de la ninhydrine sur les précipitines.

Nous désirons, avant tout, nous acquitter d'une dette de reconnaissance en rendant un particulier hommage à M. le Professeur TAYEAU, dont les conseils éclairés ont contribué si largement à notre formation scientifique et nous ont permis de mener à bien le travail que nous avions entrepris.

Ce travail n'aurait cependant jamais pu être réalisé si nous n'avions pu bénéficier d'aides variées et multiples. Nos remerciements s'adresseront tout d'abord au Centre National de la Recherche Scientifique qui, après nous avoir admise comme stagiaire de Recherches, a bien voulu nous nommer Attachée de Recherches; cette marque de confiance a constitué pour nous un très précieux encouragement.

Une grande partie de nos travaux a été réalisée au Laboratoire de Recherches du Centre de Biologie Préventive de la Caisse Régionale de Sécurité Sociale, où nous avons trouvé des collaborations précieuses et désintéressées. Nous voulons adresser encore nos remerciements à M. le Professeur Machebœuf, Professeur à la Sorbonne et à l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu mettre à notre disposition les ressources de son Laboratoire.

Enfin, sans l'aide de l'Institut Pasteur de Paris, nous n'aurions pu réaliser certaines de nos expériences; grâce à l'amabilité de nombreux chercheurs de cet établissement, nous n'avons jamais manqué de matière première et nous devons remercier tout particulièrement M. le Docteur Lafaille, Chef du Service de la Diphtérie; M. le Docteur Staub, M^lle^ M. Faure, M^lle^ A.-M. Staub, MM. les Docteurs Sandor, Rebeyrotte et Dubert.

Nous assurons encore de notre vive reconnaissance MM. Berlureau et Rivasseau, Vétérinaires en Chef des Abattoirs municipaux de Bordeaux, qui ont bien voulu nous procurer le sang nécessité par nos recherches.

Enfin, nos camarades de Laboratoire nous ont fait souvent bénéficier de leur expérience et de leur compétence : MM. Pautrizel, Neuzil, Marquevielle et Jensen ont droit à notre gratitude.

Après avoir rappelé brièvement nos connaissances actuelles sur les antigènes, les anticorps et la réaction de précipitation antigène-anticorps, nous exposerons nos recherches personnelles concernant l'action de la ninhydrine sur les immunsérums précipitants. Ces recherches sont exposées en deux parties : d'abord l'action exercée par la ninhydrine sur les propriétés floculantes des immunsérums, ensuite l'application des résultats obtenus au rôle joué par les lipides dans le phénomène de précipitation spécifique.

PREMIÈRE PARTIE

LES ANTIGÈNES ET LES ANTICORPS.

NOTIONS FONDAMENTALES.

LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE.

ÉTUDE THÉORIQUE.

CHAPITRE PREMIER

LES ANTIGÈNES ET LES ANTICORPS

Un certain nombre d'ouvrages et de revues générales ayant paru sur ce sujet (Nicolle [185], Bordet [20], Landsteiner [134, 135], Boyd [24], Machebœuf [159, 161]), nous nous contenterons, dans ce premier chapitre, de résumer les faits essentiels.

L'antigène est une substance qui, injectée à l'Homme ou à l'animal, suscite la formation d'anticorps : un individu qui reçoit, par exemple, une injection d'anatoxine diphtérique, élabore dans son organisme des anticorps antidiphtériques qui le protègent vis-à-vis de la toxine diphtérique.

L'existence des anticorps peut être mise en évidence de façons très variées. En voici quelques exemples classiques :

1° L'injection au Lapin d'une suspension de globules rouges de Mouton, par exemple, suscite, après un certain laps de temps, la formation d'anticorps antiglobules de Mouton; si l'on met en présence du sérum de Lapin ainsi immunisé une suspension de globules de Mouton, ceux-ci sont lysés. On dit alors que les anticorps sont des *hémolysines*. Il importe de noter la spécificité du phénomène; ces hémolysines ne lysent que les globules de Mouton et non ceux d'une autre espèce animale.

2° Plaçons sur la lame du microscope une suspension de bacilles d'Eberth et quelques gouttes de sérum provenant d'un individu convalescent d'une typhoïde à bacille d'Eberth (le sérum de cet individu contient des anticorps dus aux bacilles d'Eberth que son organisme a hébergés) ; après quelques instants, nous allons constater que les bacilles se sont agglutinés. Nous dirons que le sérum contient des anticorps

qui sont ici des *agglutinines*. La spécificité du phénomène s'avère encore très grande : les agglutinines n'agglutinent pas, par exemple, les suspensions de bacille paratyphique A ou B.

3° Injectons au Lapin une solution de pseudoglobulines de Cheval. Trois semaines plus tard, recueillons le sérum de ce lapin et mettons le en présence de la solution de pseudoglobulines de Cheval; après quelques minutes, nous allons voir apparaître un louche, puis un précipité. Le Lapin a élaboré des anticorps, que nous désignerons ici sous le nom de *précipitines*.

Dans ces divers exemples, les globules rouges de Mouton, les bacilles d'Eberth, la pseudoglobuline de Cheval représentent des antigènes qui ont suscité la formation d'anticorps : des *hémolysines*, des *agglutinines*, des *précipitines*.

Les divers noms de ces anticorps ne correspondent nullement à des substances de nature différente : « l'étiquette » ainsi donnée à ces anticorps se trouve simplement conditionnée par l'expérience réalisée : deux types différents ne peuvent très bien constituer que deux aspects d'un même phénomène. Aussi, admet-on aujourd'hui, avec Zinsser [299], que les anticorps sont tous du même type et ne se distinguent les uns des autres que par leur spécificité.

I. — LES ANTIGÈNES

Dès le début, seules les protéines ont été reconnues comme substances capables d'être antigènes; tous les antigènes utilisés, qu'ils soient d'origine microbienne, animale ou végétale, contenaient toujours des protéines. De plus, tous les réactifs susceptibles de dénaturer les protéines faisaient disparaître parallèlement les propriétés antigéniques. A quelle différence de structure allait-on rattacher la différence de spécificité existant entre la toxine diphtérique et la toxine tétanique par exemple ?

La spécificité nouvelle créée par la nitration d'une protéine antigène (Obermayer et Pick [190]) laissait supposer que cette différence de spécificité pouvait très bien être rattachée à l'existence d'une certaine fonction chimique. Le problème se présentait d'une manière complexe, car le nombre de fonctions que l'on peut greffer directement sur une protéine reste assez restreint. Landsteiner [voir 158] résolut néanmoins le problème en fixant sur les protéines, par l'intermédiaire d'un

groupement di-azo, un noyau benzénique porteur de fonctions déterminées. Il réalise ainsi la synthèse de véritables antigènes artificiels que l'on peut schématiser par « P. D. S. », dans lesquels « P » représente la protéine, « D » le chaînon di-azo et « S » le noyau benzénique porteur d'une fonction ou d'un groupe de fonctions déterminées. Si l'on injecte à l'animal le dérivé P. D. S. dans lequel « P » est constitué par une globuline de Mouton, par exemple, l'animal élabore des anticorps capables de réagir avec la globuline de Mouton ou avec P. D. S. dans lequel « P » est constitué par une protéine de Porc, par exemple. Une nouvelle spécificité liée à « S » est donc apparue. La substance « S » est capable, elle aussi, de réagir avec les anticorps, mais elle n'est pas antigène, car injectée seule elle ne peut susciter chez l'animal l'élaboration d'anticorps. Cette substance « S » est désignée sous le nom de *haptène*.

La spécificité des antigènes de Landsteiner est parfois très étroite; elle peut être liée, par exemple, à la position respective de deux fonctions chimiques, à la configuration spatiale du groupement hapténique, etc. [133].

Cette notion de haptène a fait faire un grand pas aux recherches sur la constitution des antigènes; on pouvait se demander cependant si les antigènes naturels allaient être caractérisés eux aussi par une substance déterminée ou par un groupe de fonctions chimiques.

A. — Haptènes naturels

Heidelberger et Avery [103] sont parvenus à isoler de la capsule du pneumocoque III une substance susceptible de réagir avec le sérum antipneumococcique et capable, lorsqu'elle est couplée à une protéine, de susciter chez l'animal l'élaboration d'anticorps antipneumocoques III. Il s'agit donc bien d'un haptène. Cette substance est un polyholoside à base d'acide glucuronique et de β glucose.

D'autres haptènes du même type ont pu être isolés par la suite : haptènes des pneumocoques II et I [107], de la bactérie charbonneuse [120, 289], du bacille de Friedlander, etc. Des haptènes protidiques (Ivanovics [120, 289]) et lipidiques (Anderson; Machebœuf, Lévy et Faure [157, 72]) ont pu également être mis en évidence.

B. — Antigènes non protéidiques

A la suite des travaux précédemment exposés, il apparaît donc que les antigènes sont des protéines et que leur spécificité se trouve liée à l'existence d'une substance ou d'un groupement fixé à la molécule protéidique.

La découverte des antigènes glucido-lipidiques (Boivin [17], Morgan [179]) et des antigènes pneumococciques constitués par des polyholosides acétylés (Avery [9]) allait détruire cette conception. Il était cependant intéressant de noter que, si les antigènes n'étaient pas obligatoirement des protéines, ils étaient toujours constitués par des substances présentant une masse moléculaire relativement élevée.

Cette idée, qui a prévalu pendant quelques années, devait à son tour être abandonnée par certains depuis la mise en œuvre de techniques très sensibles (mesure des variations de viscosité). Loiseleur [148] démontrait que des substances de petit poids moléculaire, comme le saccharose, le salicylate de sodium, l'acétate de sodium, la streptomycine peuvent, elles aussi, susciter la formation d'anticorps. Si les faits mis en évidence par Loiseleur sont indiscutables, l'interprétation donnée par l'auteur n'est pas admise par tout le monde (voir discussion au colloque d'immunochimie des Journées médicales, Bordeaux, 1952 [43]). Cette découverte laisse néanmoins prévoir de nouveaux développements de l'immunochimie.

On peut donc conclure que les antigènes naturels sont généralement des substances présentant un poids moléculaire élevé, souvent de nature protéidique et caractérisées par l'existence d'un groupement auquel se trouve liée la spécificité. Ce groupement est habituellement désigné sous le nom de *groupement déterminant*.

II. — LES ANTICORPS

On a reconnu très tôt la nature protéidique des anticorps : tous les réactifs qui attaquent plus ou moins les protéines lèsent parallèlement les propriétés spécifiques des anticorps. Des études mettant en jeu le relargage par les sels minéraux [42], l'ultrafiltration [87], l'ultracentrifugation [155] et l'électrophorèse [281] ont permis de constater que les anticorps sont des globulines et plus précisément des γ-globulines. Quelle différence existe-t-il donc entre une γ-globuline

anticorps et une γ-globuline normale (*) ? La première se distingue de la seconde par l'existence d'un goupement spécifique. Ce groupement est-il réparti sur toute la surface de la molécule ou bien sur un point particulier ? Il semble que le groupement spécifique se trouve localisé dans une certaine région de la molécule, car NORTHROP [187] est parvenu, en soumettant l'antitoxine diphtérique de Cheval à la protéolyse trypsique, à réduire la masse moléculaire de vingt fois environ, tout en augmentant considérablement à poids égal les propriétés antitoxiques.

Sur l'origine des anticorps, nous possédons aujourd'hui quelques notions dont on trouvera un exposé très détaillé dans une revue de MACHEBŒUF [161, 164]; en voici l'essentiel :

Lorsqu'un antigène pénètre dans l'organisme, il est capté par les éléments du système réticulo-endothélial qui font subir à cet antigène des modifications (EHRICH et HARRIS [68]), dont le but est peut-être de le rendre plus apte à susciter la formation d'anticorps. L'antigène ainsi « modifié » est alors capté par les lymphocytes, et dans certains cas peut-être par les plasmocytes (FAGRAEUS [73]). Les lymphocytes et les plasmocytes élaborent à l'état normal les molécules de γ-globulines. La structure interne de ces cellules subit, sous l'influence de la molécule d'antigène, une transformation; les nouvelles molécules de γ-globulines élaborées reflètent l'empreinte de cette transformation et deviennent ainsi porteur d'un groupement spécifique. Des expériences réalisées par PAULING [199] donnent une idée sur le mécanisme de formation de cette empreinte. Enfin, la libération des anticorps dans la circulation se trouve sous la dépendance d'un mécanisme hormonal (DOUGHERTY, WHITE et CHASE [57]).

L'anticorps est donc une γ-globuline caractérisée par l'existence d'un motif spécifique.

III. — LA RÉACTION ANTIGÈNE - ANTICORPS

L'antigène est capable, *in vivo* comme *in vitro*, de se combiner à l'anticorps correspondant. Il en résulte des phénomènes variés : hémolyse, bactériolyse, agglutination, précipitations,

(*) On peut toujours se demander si une γ-globuline normale n'est pas tout simplement une γ-globuline-anticorps dont la propriété spécifique n'a pas été mise en évidence (voir à ce sujet GRABAR [88]).

auxquels nous avons fait allusion au début de ce chapitre. Les recherches que nous présentons dans ce travail portent sur la réaction de précipitation. Cette réaction a très souvent été choisie comme type d'étude de la combinaison antigène-anticorps. Il est vrai qu'elle présente de très notables avantages : elle permet l'isolement du complexe antigène-anticorps en vue de son étude, elle permet la dilution ou la salification du milieu, ce qui est impossible à réaliser avec la réaction d'hémolyse par exemple. Elle ne fait pas intervenir le complément ou alexine qui, dans d'autres réactions, joue un rôle primordial. On peut enfin augmenter sa sensibilité par l'usage de divers réactifs. On conçoit donc aisément que cette réaction ait été utilisée, de préférence, pour les travaux envisageant l'aspect physicochimique de la réaction antigène-anticorps.

CHAPITRE II

HISTORIQUE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

C'est en 1897 que, pour la première fois, le phénomène de précipitation spécifique a été décrit : KRAUS [130] a constaté, en effet, que si l'on ajoute le filtrat d'une culture microbienne à l'immunsérum correspondant, on voit apparaître après un certains laps de temps un louche puis un précipité. A la suite d'expériences réalisées avec les bacilles cholérique, typhique et pesteux, KRAUS [130] a attiré l'attention sur la spécificité du phénomène. Les observations de KRAUS furent confirmées puis étendues à des systèmes mettant en jeu d'autres bactéries.

Les extraits bactériens allaient-ils constituer les seules substances capables d'amener la précipitation spécifique avec leurs immunsérums ? Non, car BORDET [18] et TCHISTOVITCH [276] démontraient simultanément que les protéines animales étaient susceptibles, elles aussi, de provoquer le phénomène de précipitation lorsqu'on les mélangeait à l'immunsérum correspondant. Ainsi, le sérum d'un lapin, préalablement immunisé par du sérum de Poule, se trouble quand on le met en présence de ce dernier; l'inverse est également vrai [20].

Par la suite, les protéines animales les plus variées ont été étudiées : le blanc d'œuf de Poule (UHLENHUTH [285]), les protéines du cristallin, les transsudats, les exsudats, les urines albumineuses, le liquide céphalorachidien normal ou pathologique, les protéines extraites des ténias, les venins de serpent, le miel, etc.

Enfin, on a pu montrer (Jacoby [121]) que les protéines d'origine végétale pouvaient également susciter la formation de précipitines. Parmi les protéines étudiées, mentionnons la ricine, les protéines des céréales [128], les protéines des légumineuses, etc. Pour obtenir ces immunsérums, il suffit d'injecter à l'animal les germes ou encore les protéines extraites du milieu de culture de ces germes. Après trois semaines environ, on saigne l'animal pour extraire le sérum.

La spécificité, sur laquelle Kraus avait, dès le début, attiré l'attention, fut reconnue par Bordet et étudiée en détail. Cette spécificité s'avère parfois plus étendue que ne le laissaient prévoir les premières expériences : ainsi, par exemple, le sérum de Lapin anti-Poule, qui précipite lorsqu'on le met en présence du sérum de Poule, donne également un léger précipité avec le sérum de Pigeon; il ne précipite pas, cependant, en présence du sérum des mammifères.

La sensibilité de la réaction de précipitation est grande, et Uhlenhuth [284] a pu mettre en évidence des traces de précipitines grâce à sa méthode de l'anneau : la technique consiste à placer l'immunsérum dans un tube puis à déposer à la surface du liquide l'antigène sans mélanger les deux solutions. Après un certain temps, on voit apparaître à l'interface un anneau.

Malgré sa simplicité, la réaction de précipitation présente des qualités de spécificité et de sensibilité. Ces qualités ont été mises en pratique dès le début : en médecine vétérinaire, pour le diagnostic de la morve (Miessner et Pfeifer [176]) et du charbon (Ascoli [8]); en médecine légale, pour la caractérisation des taches de sang; en toxicologie, pour les empoisonnements par les champignons; dans les services de la répression des fraudes, etc.

De nombreuses recherches ont été tentées dans le but de préciser le mécanisme de la réaction de précipitation spécifique. Leur exposé fait l'objet du chapitre III.

CHAPITRE III

LA PREMIÈRE PHASE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Lorsque l'on mélange en proportions convenables un antigène et l'immunsérum précipitant correspondant, on voit apparaître après un certain temps un louche, puis un floculat qui se résoud finalement en un précipité. Grâce à des techniques physiques, auxquelles nous allons avoir l'occasion de faire allusion, on a pu démontrer que bien avant l'apparition du louche, la combinaison antigène-anticorps a commencé. Aussi, peut-on considérer deux parties dans la réaction : la combinaison antigène-anticorps et le phénomène de précipitation. Bien avant que l'on ait pu mettre ces faits en évidence, Bordet [18] considérait déjà ces deux parties qu'il intitula *les deux phases* de la réaction.

Cette conception est peut-être un peu trop absolue : il ne semble pas que les deux phénomènes aient lieu séparément; il est même probable que lorsqu'apparaît le louche, la combinaison antigène-anticorps continue encore à s'effectuer : cependant, il s'avère commode, pour l'étude de la réaction, de considérer séparément les deux phases distinguées par Bordet.

I. — FORCES INTERMOLÉCULAIRES FORTES

Landsteiner [134] a pu obtenir des précipitines en injectant des antigènes dont il pouvait modifier la structure chimique. Les antigènes artificiels lui permirent de montrer que les groupements déterminants peuvent être représentés par une ou plusieurs fonctions chimiques, acide par exemple. Il était

donc logique de penser que l'antigène et l'anticorps pouvaient s'unir par des liaisons électrovalencielles. De nombreux faits plaident en faveur de cette hypothèse. Landsteiner a remarqué que les fonctions acide des antigènes jouent un grand rôle, car leur estérification provoque des modifications de la spécificité. Il a remarqué également que les acides inorganiques pouvaient donner lieu à des réactions voisines de l'hémaglutination ou de l'hémolyse produites par des agents sérologiques. Goebel et Hotchkiss [83] constatent, d'autre part, que les antigènes non protéidiques ont souvent un caractère acide : ainsi, les sérums de chevaux antipneumococciques de type I, III, VIII réagissent avec des antigènes artificiels contenant des radicaux acides, tels que le groupement sulfonique.

Chow et Goebel [41], de leur côté, attribuent l'affinité entre les polyholosides du pneumocoque et les anticorps correspondants à l'attraction mutuelle des groupes acides uroniques ionisés et des protéines [41]. Enfin, Heidelberger et Kendall ont mis également en évidence la grande influence des groupements polaires sur la spécificité des réactions sérologiques; ils pensent même que la rapidité du premier temps, ainsi d'ailleurs que la réversibilité de la réaction de précipitation plaident en faveur d'un mécanisme ionique.

Le groupement déterminant ne serait sans doute pas constitué par une seule fonction, mais par un groupe de fonctions dont les positions respectives interviendraient dans la spécificité. Landsteiner [132, 133], Danielli, Danielli et Marrack [47] confirment cette conception par une méthode physique : on sait que l'étalement des protéines en lames minces entraîne des modifications de structure; les fonctions chimiques ne sont cependant pas altérées; or, ces auteurs ont constaté que les protéines-antigènes, traitées de cette façon, ne réagissent plus avec l'anticorps correspondant.

En conformité avec ces travaux, Loiseleur [145] a formulé l'hypothèse que les groupements déterminants de l'antigène peuvent être représentés par un ensemble de fonctions ioniques; un anticorps capable d'entraîner la floculation d'un antigène protéique devrait donc neutraliser simultanément l'ensemble de toutes les charges électriques comme s'il constituait la « réplique électrique » de cet ensemble. Ainsi, Loiseleur [145] a pu inverser le signe des fonctions acides et basiques des protéines (par une technique d'électrodialyse), sans toutefois modifier leur position spatiale. Ces contre-protéines ainsi obtenues constituent des *contre-antigènes* qui

peuvent précipiter la protéine originale. Rappelons encore à ce sujet les travaux de Teague et Field [277] montrant que les charges des bactéries et des agglutinines correspondantes sont opposées.

Si toutes ces expériences mettent bien en évidence le rôle des liaisons électrovalencielles, il existe des travaux qui montrent que ce type de liaisons ne peut suffire à expliquer le mode d'union entre l'antigène et l'anticorps : Viscontini [292], par des mesures de grande précision, n'a pas pu trouver de modifications de la charge des bactéries au cours de leur union aux agglutinines. Enfin, récemment, Tayeau et Marquevielle [263], grâce à des mesures optiques, ont montré que le blocage des fonctions basiques des anticorps précipitants soit par le formol, soit par le monobromacétate n'empêche pas la première étape de la combinaison antigène - anticorps.

II. — FORCES INTERMOLÉCULAIRES FAIBLES

Parmi les forces intermoléculaires faibles, les liaisons de Van der Waals ont été invoquées. Les forces de Van der Waals sont dues à l'attraction électronique entre les atomes d'une molécule et ceux d'une molécule voisine; elles sont inversement proportionnelles à la distance qui sépare ces atomes; l'union des deux molécules est ainsi d'autant plus solide que les parties de leur surface qui peuvent s'accoler sont plus étendues.

Pour qu'il se produise une union stable entre l'antigène et l'anticorps, il faut que les motifs spécifiques de l'anticorps et les groupements déterminants de l'antigène manifestent de nombreuses forces d'attraction mutuelle; la position réciproque de ces divers groupements joue donc aussi un rôle important.

La liaison hydrogène [243] résulte de l'attraction d'un atome d'hydrogène attaché à un atome électronégatif par une paire d'électrons non partagés d'un autre atome électronégatif. D'après Pauling [195] et Huggins [119], cette liaison joue un rôle important dans la structure des protéines, en particulier des protéines globulaires, car elle permettrait le repliement des chaînes polypeptidiques primaires. Il est donc permis de penser que ce mode de liaison intervient aussi dans l'union de l'antigène et de l'anticorps.

Pauling [197] pense que d'autres types de liaisons peuvent aussi intervenir dans la première phase de la réaction antigène-anticorps : ce sont les liaisons dipole-dipole, dipole-ion, etc.

Les forces de Van der Waals, qui représentent des forces à une relative grande distance, ont sans doute été les plus invoquées. Il est possible de concevoir l'existence de telles forces à distance dans l'union de l'antigène et de l'anticorps. Rothen [224, 225, 226] a effectué une série d'expériences montrant qu'un film d'antigène peut réagir avec l'anticorps à travers une lame isolante de stéarate de baryum, par exemple. L'interprétation de ce type d'expériences a été vivement critiquée par Pauling [198], Schulman [242], Karush et Siegel [125], Singer [244]. Ces auteurs doutent de l'homogénéité de la couche isolante de stéarate de baryum, et pensent que la réaction peut se produire grâce à l'existence d'interstices. Récemment, Rothen a réfuté ces arguments et s'appuie sur le fait que le champ de ces forces à distance peut s'étendre jusqu'à une centaine d'angström. On trouvera une discussion sur ces travaux dans une toute récente revue de Tayeau [255].

D'autres recherches laissent soupçonner l'existence possible de liaisons intermoléculaires faibles. Signalons, à ce sujet, les travaux de Marrack [168], Erlenmayer et Berger [71], Royer [227], Deicha [50], Nellenstein [181].

III. — ÉNERGIE DE FORMATION DU COMPLEXE ANTIGÈNE-ANTICORPS

Les premières hypothèses sur la nature des liaisons unissant l'antigène et l'anticorps faisaient intervenir un mécanisme essentiellement chimique. Si les forces mises en jeu dans la combinaison de l'antigène et de l'anticorps sont du type électrovalenciel, par exemple, la chaleur dégagée dans la réaction doit se montrer d'un ordre de grandeur compatible avec les lois de la thermodynamique classique. C'est pourquoi Arrhenius et Madsen [7], cherchant à étayer leurs conceptions concernant la nature des liaisons antigène-anticorps sur des bases expérimentales, effectuèrent des essais en vue de déterminer la chaleur dégagée au cours des réactions immunologiques. Grâce à des mesures indirectes, ils ont trouvé qu'il se dégage 5.480 calories par molécule d'antigène.

Les premières mesures calorimétriques directes furent réalisées par Bayne-Jones [14] qui a mis en évidence un dégagement de 0,0645 calorie par unité antitoxique pour le système toxine diphtérique-antitoxine diphtérique. Cependant, Smith et Marrack n'ont pu confirmer ces chiffres qui paraissent beaucoup trop élevés.

Utilisant le calorimètre de Conn, Gregg, Kistiakowsky et Roberts, Boyd [25] a mesuré la chaleur dégagée à 31° C au cours de la précipitation du sérum de Cheval antihémocyanine par l'hémocyanine du *Busycon canaliculatum*. Il a trouvé une valeur de 40.000 calories par molécule d'antihémocyanine combinée.

Récemment, Wurmser et ses collaborateurs [297] ont étudié l'isohémagglutination; ils ont calculé que l'énergie de formation du complexe est de l'ordre de 19.000 calories par molécule d'hémagglutinine combinée. Cette valeur correspondrait à la formation de quatre liaisons hydrogène ou à une vingtaine d'attractions de Van der Waals par molécule d'agglutinine (*).

Signalons, enfin, les récents travaux de Haurowitz et Etili [99] sur différents systèmes précipitants. Les chiffres trouvés sont du même ordre de grandeur que ceux établis par Wurmser et ses collaborateurs.

Quel peut-être l'avenir de ces déterminations ? D'après Wurmser [297], celles-ci permettraient d'envisager l'étude des sérums d'origines diverses, les résultats différant suivant l'espèce donneur d'anticorps. Du point de vue théorique, Wurmser [298] pense que les résultats obtenus « dépendent de l'idée que l'on se fait de la structure du complexe, de la valence des constituants et des inter-réactions entre les groupes réactifs d'une même molécule ».

Ces mesures ont permis, de toute façon, de mettre en évidence la stabilité du complexe.

IV. — DISSOCIATION DU COMPLEXE ANTIGÈNE-ANTICORPS

Suivant la plus ou moins grande stabilité de la liaison antigène-anticorps, il faut utiliser des réactifs plus ou moins énergiques pour dissocier le complexe.

(*) Dans une récente revue de Tayeau [255], on trouvera des détails sur les calculs de Wurmser.

Les sels minéraux se montrent capables de dissocier un certain nombre de précipités. Ainsi, les anticorps antipneumocoques sont particulièrement faciles à dissocier. Dans d'autres cas, il est nécessaire d'utiliser des réactifs plus énergiques, tels que les acides organiques [85], la strontiane [75], etc.

V. — VITESSE DE COMBINAISON ANTIGÈNE-ANTICORPS

Les expériences montrant la rapidité de combinaison entre l'antigène et l'anticorps abondent. Certaines, parmi ces expériences, consistent à doser, en fonction du temps, les constituants restés libres; d'autres mesurent, par des techniques physiques, l'accroissement particulaire dû à l'union de l'antigène et de l'anticorps.

Les expériences consistant à doser les éléments restés libres ont porté sur divers systèmes. Voici quelques chiffres trouvés dans la littérature :

a) Toxine diphtérique - antitoxine de Cheval (Follensby et Hooker [77]) : combinaison totale en dix minutes.

b) Polyholoside du pneumocoque - antisérum correspondant [173] : 90 p. 100 des constituants sont combinés en trois secondes à 0°.

c) Ovalbumine - antisérum correspondant [111] : combinaison en vingt secondes.

Des mesures calorimétriques montrent que la réaction peut être complète en quelques minutes. Les mesures ont été effectuées au moyen d'un calorimètre spécial mis au point par Boyd et ses collaborateurs [25] avec le système hémocyanine-antihémocyanine de Cheval.

Enfin, les mesures physiques mettant en jeu l'accroissement particulaire permettent de constater aussi la rapidité de la première étape de la réaction de précipitation. En 1934, Lecomte du Noüy [141] a signalé l'accroissement brusque de la viscosité d'un immunsérum lorsque l'on ajoute l'antigène homologue, grâce à la mise en œuvre d'un viscosimètre qui permet de suivre l'évolution du phénomène [142]. Lumière et Meyer [153], ainsi que Coppo [46], ont également constaté la rapidité du premier temps de la réaction de précipitation par la méthode viscosimétrique. Loiseleur et M^lle^ Lévy [151] ont prouvé, par cette méthode également, que la combinaison

des antigènes de faibles poids moléculaires avec les anticorps correspondants constituait aussi une réaction rapide.

La diminution de l'indice réfractométrique du milieu au moment où l'antigène se combine à l'anticorps montre également la rapidité de la réaction antigène-anticorps.

Enfin, la détermination de la lumière latérale diffusée permet de suivre aussi l'évolution de la réaction de précipitation antigène-anticorps. Citons, à ce sujet, les travaux de Gitlin et Edelhoch [80], Goldberg et Campbell [84], Tayeau et Marquevielle [262].

Quelle que soit la technique utilisée, la vitesse de combinaison entre l'antigène et l'anticorps varie avec la nature de l'immunsérum mis en jeu, la dilution du milieu et les proportions respectives d'antigène et d'anticorps. Dans tous les cas, cette vitesse est grande.

CHAPITRE IV

LA DEUXIÈME PHASE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Lorsque l'on mélange une solution antigénique avec une quantité convenable de l'immunsérum précipitant correspondant, on voit apparaître à la longue un louche qui s'intensifie avant de se résoudre en un précipité qui se dépose au fond du récipient où s'est effectuée la réaction. Le précipité ainsi obtenu est constitué surtout par l'antigène et par l'anticorps. La présence de l'antigène dans le précipité fut démontrée par Von Dungern [64] qui, mettant en œuvre un antigène à base de cuivre (hémocyanine), put caractériser ce métal dans le précipité spécifique. La présence de l'anticorps ne fut mise en évidence que beaucoup plus tard, lorsque fut élucidé le problème de la nature des anticorps. Le précipité spécifique contient, en outre, des lipides provenant de l'immusérum, le complément, enfin des protéines non spécifiques. La plus grande partie des substances non spécifiques peut être éliminée à l'aide de lavages à l'eau physiologique [170], car le précipité présente une très faible solubilité dans ce solvant (0,05 à 0,005 mg d'azote par cm^3 d'eau physiologique). Cette constatation permet d'obtenir le précipité spécifique dans un état de pureté assez satisfaisant.

L'analyse du précipité montre que sa composition dépend de plusieurs facteurs, en dehors de la proportion relative d'anticorps et d'antigène sur laquelle nous allons avoir l'occasion de nous étendre; elle est fonction du poids moléculaire de l'antigène : lorsque l'on utilise des antigènes de poids moléculaire élevé, le précipité contient en majeure partie l'anti-

gène; dans la plupart des cas, cependant, l'antigène présente une masse moléculaire nettement inférieure à celle de l'anticorps, et le précipité est constitué pour une grande part par l'anticorps.

Pour observer ce phénomène de précipitation, il est indispensable que l'antigène et l'anticorps soient mélangés dans des proportions convenables : il faut que le rapport antigène-anticorps ne sorte pas de certaines limites. Au delà de ces limites, la précipitation n'apparaît plus. Cette constatation nous amène à exposer le phénomène de zone.

I. — PHÉNOMÈNE DE ZONE

Pour mettre en évidence la zone de précipitation, on prépare généralement un certain nombre de tubes contenant chacun un même volume d'immunsérum et des quantités variables d'antigène (procédé α) ; on peut aussi faire l'inverse et mettre en présence des volumes constants d'antigène et des quantités variables d'anticorps (procédé β). Quel que soit le procédé mis en jeu, on constate que l'aspect des tubes évolue avec le temps. Dans l'un ou deux d'entre eux, on voit apparaître un louche, puis la zone des échantillons qui se troublent s'élargit. Plus tard, les louches qui se sont intensifiés se sont résolus en précipités. Cependant, les tubes des extrémités de la série ont conservé leur limpidité. Après quelques temps, le phénomène n'évolue plus et certains des tubes de la série contiennent un précipité plus ou moins abondant. Les tubes des extrémités restent limpides; dans la région d'excès d'antigène, ces tubes correspondent à la *prézone* ou *prozone* ou *zone d'inhibition* (Heidelberger) ; dans la région d'excès d'anticorps, ils correspondent à la *postzone*.

A. — Aspect du phénomène

On a essayé de préciser le phénomène de zone au moyen de différentes méthodes. Les méthodes volumétriques et néphélémétriques [74, 220] n'ont pas donné de résultats bien concluants. La méthode la plus précise consiste à déterminer la teneur en azote total du précipité par la technique de Kjeldhal. Cette méthode (Heidelberger et Kendall [104]) a permis d'estimer de très petites quantités de précipité (de l'ordre de 10 γ). Il est ainsi possible de tracer les courbes

représentatives de la quantité totale d'azote contenu dans le précipité en fonction par exemple de la quantité d'antigène ajoutée à une quantité fixe d'anticorps. Pour un certain volume d'immunsérum, l'abondance du précipité dépend tout d'abord de la richesse en anticorps de l'immunsérum, puis de la proportion d'antigène ajoutée. Au fur et à mesure que l'on ajoute l'antigène, la quantité de précipité croît jusqu'à un maximum; elle décroît ensuite graduellement lorsqu'on s'approche de la zone d'inhibition.

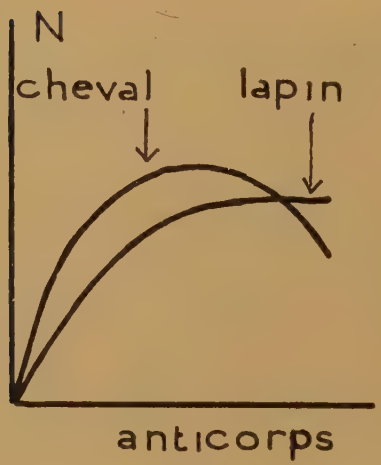


Fig. 1.

Azote total précipité en fonction de la quantité d'anticorps ajoutée à l'antigène.

Si l'on effectue l'analyse des eaux mères de chaque échantillon, on retrouve également le phénomène de zone : on constate qu'il y a présence de l'anticorps dans les tubes contenant un défaut d'antigène; on retrouve au contraire l'antigène là où l'anticorps n'a pas été ajouté en quantité suffisante. Entre ces deux régions, on observe un ou plusieurs tubes dans le contenu desquels l'analyse ne décèle ni antigène, ni anticorps. Cette région constitue la zone d'équivalence. Elle correspond généralement à la précipitation totale de l'anticorps, mais cette correspondance n'est pas toujours absolue.

Tous les immunsérums ne donnent pas des courbes de précipitation de même type [191]. Des études systématiques effectuées avec des immunsérums variés montrent que l'aspect des courbes est parfois fort différent. Les divers sérums de chevaux antitoxiques donnent un précipité avec la toxine correspondante dans une zone relativement étroite; il se forme des complexes solubles aussi bien pour un léger excès d'anticorps que pour un léger excès d'antigène (fig. 1).

Pour les immunsérums de Lapin et les sérums de Cheval antipolyholosides spécifiques, il peut se former un précipité qui persiste dans la région d'excès d'anticorps (fig. 1) ; cependant, on observe toujours une zone d'inhibition. On observe,

enfin, tous les intermédiaires lorsque l'on étudie, pour un sérum de Lapin, le poids d'azote précipité en fonction du rapport anticorps-antigène. On distingue ainsi une zone d'inhibition complète, une zone d'inhibition partielle, une zone d'excès d'antigène, une zone d'équivalence, enfin la zone d'excès d'anticorps.

Avec les sérums de chevaux, on obtient, en outre, une zone d'inhibition partielle de l'anticorps, et une zone d'inhibition complète de l'anticorps.

B. — Comparaison des procédés α et β

En faisant varier les concentrations relatives de l'antigène et de l'anticorps d'un même système immunologique, d'une part selon le procédé α, d'autre part selon le procédé β, on a constaté que les zones ne sont pas toujours superposables (voir à ce propos Marrack [168]). Il se produit toujours une zone d'inhibition pour l'excès d'antigène, tandis qu'il ne se produit pas toujours une inhibition dans la zone d'excès d'anticorps; cette inhibition dans la zone d'excès d'anticorps apparaît seulement dans le cas du procédé β.

C. — Union de l'antigène et de l'anticorps en proportions variables

Nous avons constaté que, suivant les proportions d'antigène et d'anticorps du mélange, il apparaît une quantité plus ou moins grande de précipité. Le précipité est-il toujours constitué par un composé mixte ayant une constitution fixe ou bien la composition peut-elle varier en fonction des proportions de l'anticorps et de l'antigène mis en présence ?

Il n'était pas facile jadis de se livrer à cette étude, car on ne disposait pas de techniques permettant de doser l'antigène seul dans le mélange. Dans les premiers essais, on déterminait le rapport de l'antigène à l'anticorps, en supposant que tout l'antigène était précipité; cette technique éliminait l'étude de la zone d'excès d'antigène où ce dernier est seulement précipité partiellement. L'utilisation d'antigènes colorés, d'antigènes contenant un élément facilement dosable [108], et récemment d'antigènes marqués [296, 100, 115], a permis de surmonter cette difficulté. Le dosage de l'azote total du précipité spécifique, et la détermination de la quantité d'antigène qu'il contient, permettent d'en déduire sa teneur en anticorps.

Les études systématiques effectuées avec un grand nombre

de systèmes montrent que l'antigène et l'anticorps peuvent s'unir dans des proportions variables. Quand on augmente la quantité d'anticorps dans le mélange, il se produit un précipité qui contient de plus en plus d'anticorps; cependant, la proportion d'antigène et d'anticorps du précipité n'augmente pas indéfiniment, elle tend assymptotiquement vers une limite.

D. — Réversibilité de la réaction de précipitation

Nous avons vu précédemment qu'il est possible de dissocier le complexe spécifique, soit par l'action des sels, soit par l'action de réactifs plus énergiques comme les acides. L'analyse du phénomène de zone montre que les complexes ne se forment pas dans la zone d'excès d'antigène ou dans la zone d'excès d'anticorps; en ajoutant l'excès de l'un ou de l'autre des constituants, on peut d'ailleurs dissocier le précipité. Ramon a pu ainsi décomposer le complexe toxine diphtérique-antitoxine par addition d'anatoxine diphtérique : il se forme un nouveau complexe anatoxine - sérum antidiphtérique et la toxine se trouve libérée.

De son côté, Teorell [278] pense que les réactions sont réversibles et qu'il existe même un état d'équilibre, car la relation linéaire obtenue, quand on considère le logarithme du rapport de l'anticorps à l'antigène en fonction de la concentration du réactif qui reste dans les eaux mères [24], plaide en faveur de la réversibilité de la réaction antigène-anticorps.

II. — LA VITESSE DE PRÉCIPITATION

A. — Application de la vitesse de précipitation a l'étude du phénomène de zone

Nous avons décrit précédemment le phénomène de précipitation spécifique et nous avons constaté que si l'on effectue des mélanges antigène-anticorps en proportions variables, la précipitation n'apparaît pas en même temps dans les divers mélanges. Les premières observations ont même montré que le mélange floculant le premier correspondait à la formation du précipité le plus abondant. La vitesse d'apparition du précipité peut donc servir de test pour apprécier le mélange où l'anticorps neutralise exactement l'antigène.

C'est bien ce qui se passe lorsque l'on étudie les systèmes sérum de Cheval - antisérum de Lapin [49], ovalbumine -

antisérum de Lapin, azoprotéine - antisérum de Lapin, polyholoside du pneumocoque - antisérum de Lapin, toxine diphtérique - antisérum de Cheval [217], etc. Cependant, il n'en est pas toujours ainsi et, pour certains systèmes, le tube floculant le premier peut correspondre à un léger excès d'antigène ou d'anticorps (Duncan [62], Taylor et Adair [275], Burnet [36]). Ces constatations ne sauraient en rien discréditer les deux techniques d'évaluation : le procédé α et le procédé β mentionnés plus haut (*).

Ces deux procédés conduisent-ils au même résultat ? Pour répondre à cette question, il est indispensable d'établir une comparaison entre les deux méthodes.

Comparaison entre les procédés α et β

a) *Procédé α.* — Dean et Webb, utilisant le procédé α, ont constaté que le mélange floculant le premier est celui dont les eaux mères ne contiennent ni antigène ni anticorps ou simplement des traces de ces dernières. L'apparition du précipité dans les différentes zones que nous avons déjà décrites, zone d'excès d'antigène, zone d'excès d'anticorps, se produit après l'apparition de la primofloculation.

Dans la zone de plus grand excès d'antigène, ou zone d'inhibition, il ne se forme pas de précipité, même après un séjour prolongé à 37° C. Il en est de même dans la zone correspondant à un gros excès d'anticorps.

Dean et Webb ont effectué des mélanges, en utilisant des dilutions de l'anticorps allant de 1 à 1/80. Ils ont constaté que, dans tous les cas, la primofloculation se produit pour un rapport constant entre l'antigène et l'anticorps. Si l'on obtient la floculation la plus rapide pour un immunsérum dilué au 1/2 et un antigène dilué au 1/8, par exemple, on obtiendra la floculation la plus rapide pour le même immunsérum dilué au 1/4 et le même antigène dilué au 1/16. C'est la *loi des proportions optima.*

Souvent, la primofloculation se produit à la fois dans deux

(*) Rappelons que le procédé α (Dean et Webb [49]), appelé encore technique des proportions optima, consiste à mettre en jeu des quantités constantes d'anticorps et des volumes égaux d'antigène de titre croissant.

Dans le procédé β (Ramon [217]), appelé encore technique de la primofloculation, on ajoute à une même quantité de toxine des volumes décroissants de sérum anticorps.

Dans les deux cas, les mélanges sont placés à 37° C; le tube qui flocule le premier correspond à la saturation de l'antigène par l'anticorps.

tubes présentant des rapports antigène-anticorps voisins : dans ce cas, on a affaire à une « zone » des proportions optima (*).

b) *Procédé β.* — Comme pour le procédé α, il existe différentes zones de précipitation qui apparaissent plus ou moins rapidement. Ces zones sont cependant différentes et la zone de floculation est généralement étroite. Au point de la primo-floculation, on ne retrouve ni antigène ni anticorps dans les eaux mères (**).

c) *Etude comparative.* — Ainsi que nous l'avons déjà constaté (voir [24, 116]), nous voyons donc que ces deux méthodes ne présentent pas les mêmes phénomènes de zone : quel que soit le procédé utilisé, il se produit un ralentissement de la floculation ou une inhibition dans la zone d'excès d'antigène, tandis que le même phénomène apparaît dans la zone d'excès d'anticorps pour le procédé β seulement. Cependant, lorsque l'anticorps se trouve en grand excès, il provoque un ralentissement de la floculation dans un cas comme dans l'autre.

Divers auteurs ont décrit en détails les différences qui existent entre les résultats obtenus avec le procédé α et ceux obtenus avec le procédé β (Boyd [24], Duncan [62], Taylor [273], Colwell [44], Miles [177]) (***). Grâce à ces études, on a pu mettre en évidence différentes classes d'anticorps : les anticorps de type « R », observés surtout avec les sérums de Lapin [20], les anticorps de type « H », rencontrés principalement chez le Cheval [24, 279] (****).

B. — Facteurs divers influençant la vitesse de précipitation

La floculation ne se produit pas en l'absence d'électrolytes : ainsi la toxine diphtérique ne précipite pas l'antitoxine correspondante dans un milieu totalement privé de sel. L'addition d'électrolyte à un tel milieu rend la réaction possible : pour une faible addition d'électrolyte, la vitesse de floculation croît en fonction de l'augmentation de la concentration en sel, puis,

(*) Voir 49, 274, 171, 62.

(**) Voir 217, 219, 272, 273, 62.

(***) On trouvera dans l'ouvrage de Boyd [24] et dans la thèse de Neuzil [183] un exposé détaillé de ces travaux ainsi que les graphiques correspondants.

(****) Cette règle n'est cependant pas absolue et quelques exceptions ont été signalées [32, 27, 279, 232, 231, 234].

à partir d'une certaine concentration, on observe l'inverse. Il existe donc une concentration optimum en sel pour laquelle la précipitation se produit le plus rapidement. Pour le chlorure de sodium, le bromure de sodium, l'iodure de sodium, cette concentration se situe entre 0,05 et 0,25 M. Les concentrations élevées en sel peuvent modifier la vitesse de floculation soit par insolubilisation des protéines, soit par dissociation du complexe antigène-anticorps.

La vitesse de précipitation dépend aussi du *p*H, et il existe une zone de *p*H optimum, comprise entre 5,5 et 9,0, pour laquelle la vitesse de floculation du système toxine diphtérique - antisérum de Cheval, par exemple, reste constante [238, 174, 172]. Cette vitesse diminue rapidement si le *p*H dépasse 9 ou s'il tombe en dessous de 5,5.

La température intervient aussi : la vitesse de la réaction de précipitation croît habituellement de 0 à 30° C. Au-dessous de 30° C, la vitesse augmente encore mais moins rapidement, et elle finit même par diminuer : ainsi elle est parfois plus lente à 56° C qu'à 37° C.

L'agitation exerce aussi une influence sur la vitesse de précipitation. D'après Eagle [65], si l'on agite immédiatement le mélange de l'antigène et de l'anticorps, la vitesse de précipitation n'est guère modifiée, mais une agitation ultérieure exerce une action favorable. Les courants de convection influencent aussi la vitesse de précipitation : c'est pourquoi l'on doit immerger les tubes de la même façon dans le bain-marie, lorsqu'on effectue une titration par la méthode de primofloculation.

En ce qui concerne la présence éventuelle des protéines sériques non spécifiques, les avis restent partagés. Hooker et Boyd [117] trouvent que les mélanges d'ovalbumine et d'anti-ovalbumine dilués avec du sérum de Lapin normal à la place d'eau physiologique floculent plus lentement; Dean (voir Marrack [168]), de son côté, constate que l'addition de sérum non spécifique n'amène aucune modification. Il faut remarquer que la concentration en protéines sériques non spécifiques varie lorsque l'on utilise le procédé β, précédemment décrit, car la quantité d'antisérum ajoutée est constamment modifiée. Il n'est donc pas impossible que ces protéines sériques non spécifiques jouent un rôle sur la vitesse de précipitation constatée au moyen de ce procédé.

Différentes substances organiques modifient la vitesse de précipitation et l'inhibent parfois totalement suivant les

porportions utilisées. Marrack [168] pense que cette inhibition est due à ce que ces produits forment des couches sur les particules et que les groupements polaires de ces particules se trouvent orientées vers l'eau. Landsteiner et Welecki [138], Downs et Goodner [59] ont réussi à inhiber la réaction de précipitation par le sucre de canne à certaines concentrations : il en est de même avec le glucose. Signalons que peu de travaux ont été effectués concernant l'action des substances tensioactives sur la réaction de précipitation : Takenomata [250] a étudié l'influence de la saponine. Les savons (Tayeau et Pautrizel [201]), les saponosides (Tayeau et Neuzil [183]) et les sels biliaires (Tayeau et Rolland [271]) n'exercent aucune influence sur la précipitation spécifique.

CHAPITRE V

SUR LA NOTION D'AVIDITÉ DES IMMUNSÉRUMS

Le terme « avidité » a souvent été employé par les immunologistes dans des sens différents. Etant donné que, dans la partie expérimentale de notre travail, nous aurons souvent l'occasion de faire allusion à cette notion, nous n'avons pas cru superflu d'en faire une rapide mise au point.

La vitesse de floculation des immunsérums est indépendante de leur titre en anticorps. Deux sérums antidiphtériques de Cheval, par exemple, ayant exactement le même titre en anticorps, peuvent très bien floculer, lorsqu'on les met en présence de la toxine, en des temps différents (*). Il existe donc un facteur propre à l'animal, qui influe sur la vitesse avec laquelle son immunsérum flocule en présence de l'antigène correspondant. Ce facteur a été appelé « avidité »; tantôt il désigne la vitesse de la combinaison antigène-anticorps (première phase de la réaction), tantôt il désigne la stabilité de la liaison antigène-anticorps (Glenny et Barr [81]), tantôt, enfin, il correspond à la vitesse de floculation.

Il nous semble qu'il ne faille pas être trop absolu dans ce domaine et que les trois facteurs évoluent parallèlement. Glenny [82] et Schmidt [237] ont noté que plus un sérum antidiphtérique neutralise facilement la toxine correspondante, plus il précipite rapidement. Ramon [218] et Schmidt [236] ont signalé de leur côté que la dissociation des complexes

(*) Signalons la généralité du phénomène : Boyd [23] a remarqué que des sérums agglutinants, qui possèdent des titres en anticorps voisins, présentent des vitesses d'agglutination fort différentes.

antigène-anticorps est d'autant plus aisée que le sérum est moins avide. Enfin, Pautrizel et Tayeau [202] ont montré que le monobromacétate de sodium retarde d'autant plus la vitesse de précipitation des immunsérums que ceux-ci sont moins avides.

Schmidt [235] considère que cette notion d'avidité reflète un facteur individuel et stable. Les travaux de Pautrizel et Tayeau [203], réalisés sur le système sérum de Cheval - antisérum de Lapin, montrent que la conclusion de Schmidt est un peu trop absolue. Tayeau et Pautrizel [203] notent, en effet, qu'au cours des périodes d'immunisation successives l'avidité varie; de plus, certains facteurs biologiques comme l'anémie, par exemple, apportent des perturbations dans la qualité des anticorps fournis et dans leur avidité.

Plusieurs théories se proposent d'expliquer l'avidité variée des immunsérums. Pour Wiener [295], cette avidité devrait être rattachée aux propriétés physiques des γ-globulines-anticorps, et en particulier à leur solubilité. Heidelberger [102] estime de son côté que l'avidité est d'autant plus grande que la correspondance entre le motif spécifique de l'anticorps et le groupement déterminant de l'antigène est plus parfaite; il signale à ce sujet l'existence de certains anticorps précipitants qui ne floculent même pas; il les appelle « anticorps univalents » ou « incomplets ». Boyd [22, 24] pense que les anticorps les moins avides portent un moins grand nombre de motifs spécifiques. Pautrizel [201] adopte ce point de vue pour expliquer les modifications de l'avidité des sérums de Lapin soumis à l'anémie expérimentale au cours des différentes périodes d'immunisation.

Quoi qu'il en soit, cette notion d'avidité présente une importance certaine en sérothérapie : entre deux sérums présentant le même titre en anticorps, le plus avide est le plus efficace au point de vue thérapeutique.

HÉTÉROGÉNÉITÉ DES ANTICORPS

La notion d'avidité permet de mettre en évidence l'hétérogénéité des anticorps. Lorsque, en se plaçant exactement au point des proportions optima, on mélange de la sérum albumine et l'immunsérum correspondant, on constate que les eaux mères contiennent de l'antigène et de l'anticorps qui n'ont pas précipité (Taylor, Adair et Adair [275]); ces

derniers seraient donc différents de ceux qui ont précipité [168]. Divers autres exemples ont été décrits [106, 168, 109, 122, 124, 105, 108] (*).

Kabat et Mayer [123] ont proposé une technique permettant de doser les anticorps « incomplets » (**). Cette technique a d'ailleurs permis à Heidelberger, Treffers et Mayer [111] de suivre l'évolution des anticorps au cours de l'immunisation.

Diverses conceptions [24, 114, 136, 137] ont été émises sur la structure possible des anticorps incomplets.

(*) Voir à ce sujet, dans l'ouvrage de Marrack [168], le paragraphe relatif aux anticorps possédant des motifs spécifiques insuffisamment adaptés.

(**) Le principe de la méthode repose sur la formation d'une quantité connue de précipité spécifique, en présence d'un volume donné de sérum contenant les anticorps incomplets et sur la mesure de l'augmentation de l'azote total du précipité spécifique.

CHAPITRE VI

MÉCANISME DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE THÉORIES DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS

Nous avons montré précédemment comment on peut concevoir l'union de l'antigène avec l'anticorps. Nous avons signalé que cette phase d'union de l'antigène à l'anticorps, première étape de la réaction, est ultérieurement suivie de la précipitation du complexe. Nous avons ensuite étudié dans quelles conditions peut se produire cette précipitation, ainsi que la nature et la composition du précipité. Il reste à envisager l'architecture de ce précipité et le mécanisme qui préside à son édification. Malheureusement, nos connaissances restent très limitées en ce qui concerne les matériaux qui constituent cet édifice : les protéines - anticorps et les antigènes. Il faudra donc se contenter d'hypothèses tant que la structure des protéines restera mal connue.

Quelles sont les lois auxquelles obéit la réaction antigène-anticorps ? Obéit-elle aux lois régissant les combinaisons chimiques ou bien aux lois régissant les phénomènes d'adsorption ?

Les premières théories proposées comparaient les réactions de précipitation antigène-anticorps à l'union d'un acide fort et d'une base forte aboutissant à la formation d'un sel (Ehrlich [69]), ou encore à la neutralisation d'une base faible par un acide fort aboutissant à un équilibre (Arrhenius [6]). Ces théories considéraient que l'antigène et l'anticorps se combinaient selon des proportions invariables.

De nombreuses expériences ont montré, nous l'avons vu, que l'antigène et l'anticorps peuvent s'unir suivant toute une gamme de proportions, et que le phénomène de floculation présente d'incontestables analogies avec la précipitation des colloïdes. On pourrait donc penser que la réaction antigène-anticorps est soumise aux mêmes lois que celles qui régissent les phénomènes d'adsorption (Bordet [20]).

Enfin, de récentes théories admettent qu'il peut se former des « ensembles » antigène-anticorps grâce à une série de réactions obéissant à la loi d'action de masse (Heidelberger [102]).

Le phénomène de précipitation est également soumis aux lois qui régissent la solubilité. Des molécules au sein de l'eau sont soumises à deux sortes de forces : les forces d'affinité pour l'eau qui favorisent le maintien en phase aqueuse et les forces de cohésion qui tendent à les rapprocher. Si la cohésion est plus élevée que l'affinité pour l'eau, le corps dissous précipite. Les molécules d'antigène et d'anticorps protéidiques possèdent des groupements hydrophiles (fonctions polaires, constituées par les -COOH, -NH_2, -SH, -OH, etc. des amino-acides) et des groupements hydrophobes (fonctions apolaires : noyaux benzéniques, chaînes polyméthyléniques). Si la combinaison antigène-anticorps se fait par l'union des groupements polaires, l'affinité pour le solvant est diminuée, les forces de cohésion augmentent et le complexe devient moins soluble. Cette conception s'appuie sur de nombreux faits : les réactifs qui modifient l'ionisation de la particule ou qui provoquent des modifications de la surface hydrophobe peuvent entraîner des modifications de la réaction de précipitation sans modifier la combinaison de l'antigène avec l'anticorps. Rappelons à ce sujet l'influence jouée par la concentration en sel, l'influence des acides et des bases, l'influence de réactifs comme le formol et le monobromacétate, l'influence des lipides de l'immunsérum mis en jeu, l'influence des polymères hydrosolubles. Enfin, Haurowitz et ses collaborateurs [96] ont démontré tout récemment, grâce à des calculs thermodynamiques, qu'au cours de l'union antigène-anticorps, il se produit une libération de molécules d'eau au niveau de la « macromolécule ».

Cependant, d'autres observations montrent que l'insolubilisation ne dépend pas « uniquement des rapports physico-chimiques entre le complexe et le milieu dans lequel il baigne » et qu'il intervient également des forces spécifiques. Ainsi, les expériences de Topley, Wilson et Duncan [283]

avec les agglutinines, montrent que, dans un mélange contenant deux antigènes différents et les anticorps correspondants, il se forme deux types de flocons homogènes composés chacun par l'un des antigènes.

Tayeau et Marquevielle [261], travaillant sur les précipitines, ont pu montrer également l'individualité de divers systèmes précipitants mis en présence, et apporter ainsi des arguments en faveur du rôle joué par les forces spécifiques.

Ainsi, nous constatons que le phénomène de précipitation présente une dualité très nette. Les différentes théories qui tentent d'expliquer le mécanisme de ce phénomène envisagent tantôt l'un de ces aspects, tantôt l'autre.

Les théories anciennes (Ehrlich, Arrhenius et Madsen, Bordet) expliquent la précipitation par des mécanismes physicochimiques. Les théories modernes (Marrack, Heidelberger, Pauling) font intervenir surtout les forces spécifiques.

I. — ANCIENNES THÉORIES

Les anciennes théories ne présentent plus maintenant qu'un intérêt historique; elles ont été, en effet, infirmées par un faisceau d'arguments expérimentaux.

Ehrlich [69], le premier, admit que la neutralisation de l'antigène par l'anticorps était tout à fait comparable à la neutralisation d'un acide fort par une base forte. Il établit lui-même la critique de sa propre théorie en décrivant un phénomène qui porte aujourd'hui son nom et qui montre que la neutralisation de l'antigène par l'anticorps est beaucoup plus complexe (*). Un peu plus tard, Arrhenius et Madsen [7] admirent que la neutralisation de l'antigène par l'anticorps était du même type que la neutralisation d'un acide faible par une base forte ou inversement; dans la plupart des cas, il se produirait un équilibre répondant à la loi d'action de masse. Un tel équilibre laisse donc sous-entendre qu'un mélange toxine-antitoxine exactement neutralisé contient de la toxine libre; ce mélange devrait donc être néfaste à l'animal auquel on l'injecte; or, il n'en est rien (Bordet [20]).

Bordet, enfin, a mis en évidence les analogies que présente la réaction antigène-anticorps avec les réactions colloïdales (*). Le complexe antigène-anticorps résulterait de l'adsorption d'une couche d'anticorps à la surface de l'antigène, cette

(*) Pour plus de détails, consulter l'ouvrage de Bordet [20].

surface pouvant être plus ou moins recouverte. Selon la théorie de Bordet, l'adsorption de l'anticorps sur l'antigène aurait un caractère spécifique, tandis que la précipitation des complexes représenterait un phénomène physicochimique.

Or, nous avons vu précédemment que le phénomène de précipitation (deuxième temps de la réaction) mettait en jeu également des forces spécifiques.

II. — THÉORIES MODERNES

Les auteurs modernes, admettant comme fait certain la possibilité de l'union de l'antigène et de l'anticorps en proportions multiples, ont cherché à préciser le nombre et la répartition des groupements déterminants de l'antigène et des motifs spécifiques de l'anticorps. Ils ont utilisé les connaissances nouvelles concernant la structure des protéines et des antigènes non protéidiques.

Ces théories mettent en jeu la notion de valence des antigènes et des anticorps que nous allons définir brièvement. Dans le langage des immunologistes, la valence des anticorps correspond au nombre de *motifs spécifiques* capables de s'unir à l'antigène, et la valence des antigènes correspond au nombre de *groupements déterminants* capables de s'unir aux anticorps.

Un certain nombre de constatations expérimentales plaident en faveur de la polyvalence des antigènes, tandis que cette question est généralement plus discutée en ce qui concerne les anticorps (*).

Les anticorps seraient polyvalents pour Dervichian et Grabar [54], bivalents pour Pauling [196], monovalents, enfin, pour Wormall et ses collaborateurs [13, 11, 12].

A. — Théorie de Marrack

D'après Marrack, l'union de l'antigène et de l'anticorps serait due à des forces spécifiques qui provoqueraient ensuite l'insolubilisation du complexe.

Les forces spécifiques mises en jeu représentent l'attraction spécifique des groupements déterminants de l'antigène pour les motifs spécifiques de l'anticorps. Si l'anticorps contient plus d'un motif spécifique et si l'antigène est également poly-

(*) On trouvera un exposé de ces questions dans [255].

valent, il est possible que les molécules d'antigène et d'anticorps se relient les unes aux autres pour former un réseau. D'après MARRACK [168], un agrégat de taille illimitée peut se former si deux groupements déterminants sont fixés à une molécule d'antigène et deux motifs spécifiques à une molécule d'anticorps.

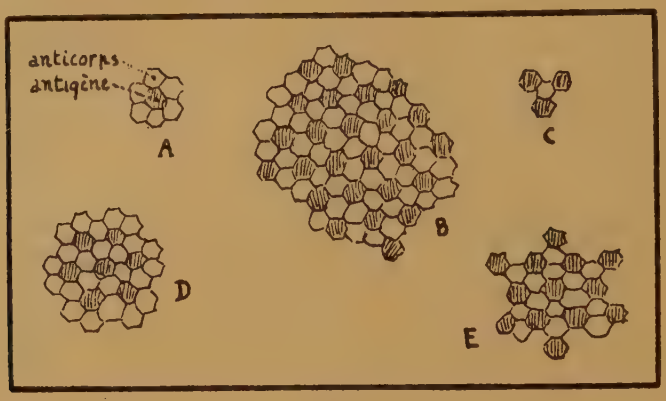


FIG. 2.

Schémas de constitution des complexes spécifiques.

A : Grand excès d'anticorps.
B : « Réseau » de la zone d'équivalence.
C : Grand excès d'antigène.
D : Excès d'anticorps.
E : Excès d'antigène.
(D'après MARRACK [168].)

Tandis que BORDET envisageait deux étapes de la réaction de précipitation, MARRACK pense que la seconde étape n'est que le prolongement de la première : « Quand les molécules d'anticorps sont rattachées à l'antigène, les groupes polaires dont dépend la solubilité de la globuline anticorps sont amenés en contact et s'attirent les uns les autres au lieu d'attirer les molécules d'eau. Seuls, les groupes polaires de la surface libre présentent de l'affinité pour l'eau. Au fur et à mesure que le volume de la particule augmente, le nombre des groupements polaires efficaces n'est plus assez élevé par rapport au volume, et la floculation se produit ».

MARRACK [168] explique la formation des complexes qui se forment dans les différentes zones de la façon suivante : lorsque l'antigène se trouve en excès, il se forme des complexes tels que C ou E de la figure 2. Les complexes C

restent en solution, car les groupes polaires des molécules d'antigène n'arrivent pas en contact. Les complexes E entourés de groupements déterminants antigéniques restent également en solution; ils ne peuvent se lier les uns aux autres pour former des agrégats plus volumineux, car ces complexes ne portent pas de molécules d'anticorps à leur surface. Lorsque l'anticorps se trouve en excès, il se forme des complexes tels que D, qui ne peuvent pas se lier les uns aux autres. La solubilité de ces complexes dépend de la nature et de l'hydrophilie de la globuline-anticorps. MARRACK explique, en outre, le fait que les molécules de haptènes simples qui ne possèdent qu'un groupement déterminant ne peuvent pas donner lieu à l'édification d'agrégats.

Un certain nombre d'expériences peuvent s'expliquer par cette théorie qui, tout au long de la réaction antigène - anticorps, fait intervenir des forces spécifiques. Citons, à ce sujet, les expériences de TOPLEY, WILSON et DUNCAN [283]; ces auteurs montrent que si l'on met en présence deux systèmes agglutinants différents, il ne se forme pas de flocons mixtes, comme il s'en ferait si les forces spécifiques n'intervenaient pas dans la formation des agglutinats. Des résultats du même ordre ont été obtenus avec les précipitines, par TAYEAU et MARQUEVIELLE [261].

B. — THÉORIE DE HEIDELBERGER

Cet auteur, admettant également la polyvalence des antigènes et des anticorps, a élaboré une théorie qui présente quelques analogies avec celle de MARRACK. Il a essayé, en outre, d'élucider le mécanisme selon lequel le volume de l'agrégat primaire devient de plus en plus important, et cherché à établir les lois de ce mécanisme. D'après HEIDELBERGER [102], il se produit une série de réactions bimoléculaires successives qui aboutissent à la formation d'un complexe volumineux s'éliminant du milieu par insolubilisation. Chaque réaction bimoléculaire serait régie par la loi d'action de masse de telle sorte que la quantité de produit formée serait proportionnelle aux concentrations des substances réagissantes. La première réaction postulée serait $G + A \rightleftarrows GA$ (1) (en désignant l'antigène par G et l'anticorps par A) suivie par exemple, dans la région d'excès d'anticorps, par

$$GA + A \rightleftarrows GA.A \quad (2)$$
$$GA + GA \rightleftarrows GA.GA$$

Une troisième étape se produirait dans laquelle les molécules A G. A G pourraient se polymériser avec A G A ou avec d'autres A G. A G. pour former des substances encore plus complexes, et la réaction évoluerait jusqu'à ce que les particules soient suffisamment volumineuses pour se séparer de la solution. « La précipitation se produit à ce moment, sans nul doute facilitée par la perte d'affinité pour l'eau des groupements polaires ionisés amenés en contact par ces séries de réactions (*). »

Grâce à ce raisonnement, HEIDELBERGER a déterminé la composition moyenne des complexes antigène - anticorps dans les différentes zones : par exemple (G A)n au point d'équivalence, G An dans la zone d'excès d'anticorps, GnA dans la zone d'excès d'antigène. De nombreux arguments expérimentaux plaident en faveur de l'hypothèse de HEIDELBERGER : l'analyse chimique de certains précipités, ainsi que leur examen au microscope électronique permettent de retrouver les compositions prévues par cet auteur (SCHRAMM, FRIEDRICH et FREKSA [241]).

Les théories de HEIDELBERGER et de MARRACK s'accordent pour affirmer que la formation du complexe dépend de forces spécifiques et que son insolubilisation ne fait intervenir aucun autre mécanisme « physique » que le déséquilibre provoqué par l'augmentation de volume du complexe.

C. — THÉORIE DE DERVICHIAN ET GRABAR

Les auteurs dont nous venons d'exposer les théories admettaient, nous l'avons vu, que l'union de l'antigène et de l'anticorps s'effectue grâce à la compatibilité de motifs spécifiques et de groupements déterminants. DERVICHIAN et GRABAR [54] ont cherché à élucider de quelle façon ces motifs spécifiques se répartissent sur les molécules d'antigène et d'anticorps.

A la suite d'études sur les lames minces de protéines, DERVICHIAN assimile les molécules de protéines à deux hémimolécules dont la juxtaposition formerait un disque à deux faces hydrophiles; l'ensemble des chaînes polypeptidiques constituant l'hémimolécule de protéine serait plus ou moins replié et fixé, par ses groupements hydrophobes, aux groupements similaires de l'autre hémimolécule, laissant à l'extérieur

(*) On trouvera un exposé détaillé concernant les différentes étapes de ces réactions bimoléculaires, ainsi que les théories mathématiques, dans les ouvrages de BOYD [24] et de MARRACK [168].

les groupements hydrophiles. La nature, le nombre et la disposition de ces groupements hydrophiles dépendent, d'une part, des aminoacides constituant les chaînes polypeptidiques, d'autre part de leur repliement. Nous savons que les différentes fonctions chimiques qui hérissent les chaînes polypeptidiques présentent une certaine périodicité. Aussi, Dervichian et Grabar pensent que ces groupements sont rangés périodiquement à la surface des molécules selon un réseau hexagonal plan. Un certain nombre de ces groupements formerait un motif spécifique ou un groupement déterminant si l'antigène est de nature protéidique. L'union des molécules d'antigène et d'anticorps dépendrait de la compatibilité de ces motifs. Dervichian et Grabar admettent également l'hypothèse de la multivalence mutuelle. D'après ces auteurs, chaque molécule d'antigène ou d'anticorps devrait être capable de s'unir à 6 molécules (ou un multiple de 6), chaque surface présentant une symétrie ternaire et étant capable de s'unir à trois molécules.

Des complexes se formeraient donc par empilement de molécules. Comme précédemment, la formule moyenne des différents complexes qui apparaissent dans les différentes zones peut être prévue : A 6 G dans la zone d'excès d'anticorps, A G 6 dans la zone d'inhibition. L'étude de la composition chimique de divers précipités spécifiques donne des résultats qui concordent d'une façon assez satisfaisante avec les résultats prévus par cette théorie. Cependant, l'étude de la diffraction des rayons X par les protéines ne confirme pas les hypothèses de Dervichian [206].

D. — Théorie de Pauling

Pauling [196] estime que la formation de réseaux peut très bien s'expliquer avec des anticorps bivalents. Certaines expériences, telle la suivante réalisée par Pauling, Pressman et Campbell [200], s'expliquent à la lumière de la théorie de la bivalence des anticorps. Ces auteurs injectent à des lapins une « azoprotéine » contenant le groupement hapténique R; ils obtiennent ainsi un sérum anti-R. Ils préparent de la même façon un sérum anti-X par injection d'une azoprotéine contenant le groupement hapténique X. Ils préparent ensuite une substance R-X contenant à la fois le groupement hapténique R et le groupement hapténique X. Ce « dihaptène » ne flocule pas en présence du sérum anti-R ou du sérum anti-X, mais il flocule en présence du mélange de ces deux immunsérums.

Pauling explique cette constatation de la façon suivante : l'anticorps anti-R étant bivalent, il faut deux molécules de l'antigène R-X pour le saturer; il ne reste donc pas de valence disponible pour former d'assemblages assez volumineux, et le complexe ainsi formé reste soluble. Le même raisonnement s'applique lorsque le dihaptène R-X est placé en présence de sérum anti-X. Lorsqu'il est placé en présence du mélange de sérum anti-R et anti-X, chacune de ces substances étant bivalente et se combinant avec ses antigènes respectifs fournit les liens nécessaires à la formation d'un réseau dans lequel les anticorps anti-R et anti-X peuvent alterner.

D'autres expériences, mettant en jeu des techniques variées (ultracentrifugation [193], dialyse [70, 71], électrophorèse [169]) plaident en faveur de la bivalence des anticorps.

E. — Théorie de la monovalence des anticorps

Les expériences précédentes ne permettent pas, toutefois, de conclure à la généralité de la bivalence des anticorps, car d'autres recherches, mettant en jeu des isotopes radioactifs (Wormall et collaborateurs [13]), sont au contraire en faveur de leur monovalence (*).

(*) On trouvera une mise au point de la question de la valence des anticorps dans une revue récente de Tayeau [255].

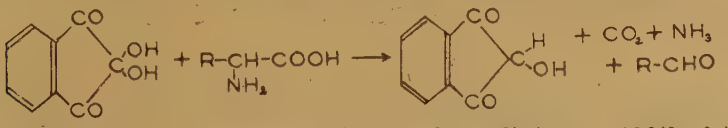
CHAPITRE VII

ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES PROTIDES

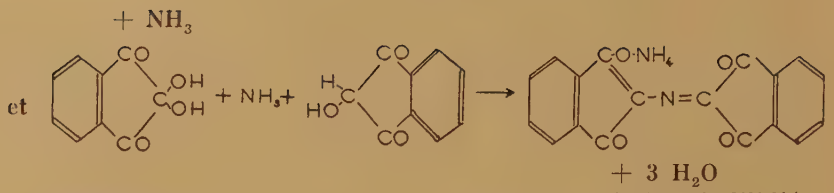
Notre travail consistant principalement en une étude concernant l'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums précipitants, nous avons estimé nécessaire de mettre au point nos connaissances sur l'action de la ninhydrine vis-à-vis des protides.

Les premières recherches mettant en jeu la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) pour l'étude des protides sont dues à RUHEMAN [228, 229]. Cet auteur a en effet observé, le premier, que si l'on traite à chaud une solution d'un aminoacide, d'un peptide ou d'une protéine par une solution diluée de ninhydrine, il apparaît une coloration bleu violet. Cette réaction se montre extrêmement sensible et permet de caractériser les aminoacides même en solution très diluée; l'histidine et le glycocolle en particulier réagissent à très faible dose avec la ninhydrine (ABDERHALDEN et SCHMIDT [3, 4]). Le mécanisme de la réaction est le suivant [228, 229] :

L'aminoacide est décarboxylé et désaminé et se transforme en aldéhyde en C^{n-1}; l'aldéhyde ainsi formé peut être facilement mis en évidence (ABDERHALDEN [2]) par sa dinitrophénylhydrazone [180]. Cette réaction d'oxydation s'effectue aux dépens de la ninhydrine, qui est réduite en hydroxydicétohydrindène. Ce dernier dérivé se condense avec une molécule de ninhydrine et, en présence de l'ammoniac dégagé, donne alors le sel de la dicétohydrindilidène - dicétohydrindamine.



(Ninhydrine) (Aminoacide) (Hydroxydicétohydrindène) (Aldéhyde)



(Ninhydrine) (Sel de la dicétohydrindilidène-dicétohydrindamine)

La ninhydrine réagit également sur le groupement sulfhydryle de la cystéine, mais le mécanisme détaillé de cette réaction n'a pas été bien précisé. Divers auteurs [92, 79, 33] ont simplement signalé que la ninhydrine inhibe certaines réactions généralement attribuées aux groupements sulfhydryle; ils en ont conclu que les groupements sulfhydryle réagissaient avec la ninhydrine.

Tayeau et M^lle Régnier [270, 221] ont montré récemment qu'il en était bien ainsi et que la ninhydrine réagit quantitativement avec le groupement sulfhydryle de la cystéine.

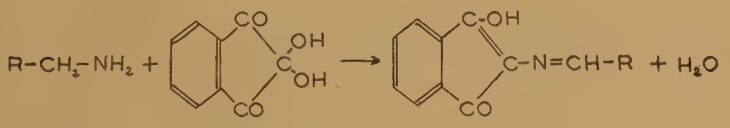
Enfin, la proline est également sensible à l'action de la ninhydrine [90, 91], mais dans des conditions que l'expérience n'explique pas [240].

Le dérivé bleu, résultant de l'action exercée par la ninhydrine sur les aminoacides, peut être aisément extrait de la solution où il s'est formé (Denigès [53]) : il suffit pour cela d'acidifier très légèrement le liquide à l'aide d'acide acétique et d'agiter la solution avec du chloroforme. Le colorant vient alors se dissoudre dans le solvant. Ce dernier prend une coloration orangée due à la formation du dérivé de déshydratation du colorant. Le résidu d'évaporation chloroformique, mis en présence d'eau, se dissout lentement en régénérant la teinte bleue violacée primitive (Denigès [53]). La matière colorante peut encore être extraite après saturation de la phase aqueuse, par le sulfate d'ammonium à l'aide d'alcool amylique (Cherbuliez et Herzenstein [40.bis]) ou, mieux, à l'aide de chloroforme (Polonovski et Moreno-Martin [210]).

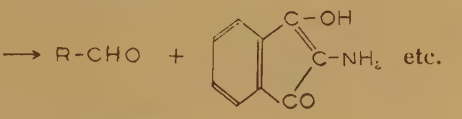
La réaction entre la ninhydrine et les protides a fait l'objet d'études quantitatives : certains auteurs, en déterminant l'anhydride carbonique dégagé, dosent les groupements aminés entrés en réaction (Polonovski [209], Bertrand [15]); d'autres, par une technique voisine, déterminent les groupes carbonyles formés (Van Slyke et Dillon [287]); d'autres encore déterminent la volatilité de l'aldéhyde (Virtanem et

Rautanem [291]) ; d'autres, enfin, mettant en jeu la coloration formée [210, 208] et la possibilité de l'extraction du colorant par le chloroforme selon Denigès, dosent l'ensemble des aminoacides (Virtanem et Laine [290]).

La ninhydrine réagit également sur les peptides et les protéines; cependant, le blocage de nombreuses fonctions d'aminoacides dans la molécule protéidique restreint son action. Schönberg, Moubasher et Mostafa [239], puis Baddar [10] ont bien défini les conditions nécessaires pour qu'une fonction amine réagisse avec la ninhydrine : il faut que le carbone en α de cette fonction soit porteur de deux hydrogènes ou bien d'un groupement électronégatif. De telles fonctions appartiennent donc soit à des molécules de glycocolle, soit à des molécules de bases hexoniques. La réaction, selon Moubasher et Othman [180], serait la suivante :



(Amine) (Ninhydrine)



(Aldéhyde)

Les fonctions amine des protéines réagissant avec la ninhydrine seraient donc limitées. Dulière [60, 61] a cependant remarqué que les fonctions amine bloquées par la ninhydrine étaient à peu près les mêmes que celles réagissant avec le formol; il est vrai que la plupart des fonctions amine des protéines appartiennent aux bases hexoniques. Eggerth [67] établit cependant une distinction entre les fonctions amine des protéines réagissant avec la ninhydrine et celles bloquées par le formol. De toutes façons, on peut conclure que la presque totalité des groupements aminés des protéines est capable de réagir avec la ninhydrine (*).

Un très grand nombre de substances, dont la liste a été donnée par Schönberg et ses collaborateurs [239] réagissent sur les aminoacides et les protéines de la même façon que la

(*) Certains auteurs [1, 282, 294] augmentent la sensibilité de la réaction par addition d'acide ascorbique.

ninhydrine. Ces substances, parmi lesquelles il faut citer le β naphtoquinone-4-sulfonate, l'alloxanne, l'isatine, le pyruvate, le diacétyle, etc., rentrent dans le cadre de la réaction de Strecker [249]. Il convient cependant de signaler que l'action exercée par ces diverses substances sur certaines propriétés biologiques des protéines est loin d'être comparable (Tayeau et Neuzil [266]).

Le traitement par la ninhydrine amène de profondes modifications des propriétés physicochimiques des protéines. Nous aurons l'occasion de revenir longuement sur ces propriétés lorsque nous discuterons le résultat de ces expériences. Signalons simplement qu'après action de la ninhydrine, les protéines sériques ont perdu certaines propriétés de solubilité (Dulière [60, 61]) : c'est ainsi qu'elles précipitent beaucoup plus facilement par les sels neutres et par les acides [67] ; de plus, leur point isoélectrique se trouve déplacé vers la région acide [67] ; elles ont perdu leurs propriétés coagulantes [60, 61, 67] ; enfin, leur spectre en lumière ultraviolette subit des modifications [154] ; les variations observées sont identiques avec le sérum de Cheval et le sérum de Lapin [67].

Il nous a semblé que cet ensemble de modifications apportées par la ninhydrine aux propriétés des protéines méritait d'être étendu aux protéines-anticorps.

Quelques auteurs ont déjà mis en œuvre l'action de la ninhydrine sur certains phénomènes immunochimiques : mentionnons en particulier les travaux d'Eggerth [67] qui ont montré une élévation du taux en agglutinines des immunsérums agglutinants traités par la ninhydrine. Signalons encore les recherches de Dulière [60, 61] et de Bricas et Machebœuf [30] sur les antigènes, dont les propriétés se trouvent modifiées.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS PRÉCIPITANTS

ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS PRÉCIPITANTS

Les nombreuses modifications apportées par la ninhydrine à la molécule protéidique nous ont incitée à étudier l'action exercée par ce réactif sur les protéines-anticorps précipitants.

Dans un premier chapitre, nos essais ont porté sur les immunsérums de Lapin (*) ; dans le second, nous avons mis en jeu divers immunsérums de Cheval. Les résultats différents obtenus avec ces deux types d'immunsérums nous ont alors amenée à étudier comparativement l'action exercée par la ninhydrine sur les sérums de Cheval et de Lapin. Cette étude fait l'objet des chapitres suivants.

(*) On trouvera des détails sur l'immunisation des lapins dans la thèse de Pautrizel [201]. Pour éviter l'apparition de chocs anaphylactiques chez nos animaux, nous avons toujours pris soin de faire précéder nos injections d'antigène d'une injection d'un antihistaminique (Phénergan R. P.).

Les prélèvements de sang au lapin ont été réalisés suivant la technique préconisée par Fagraeus [73].

CHAPITRE PREMIER

NINHYDRINE ET TEMPS DE FLOCULATION. ACTION SUR LE SÉRUM DE LAPIN

Nos premières recherches ont porté sur le système sérum de Cheval - antisérum de Lapin. Les animaux avaient été immunisés suivant la technique précédemment décrite; les prélèvements de sang étaient effectués tantôt dans la veine marginale de l'oreille (technique de Fagraeus [73]), tantôt par voie intracardiaque [186]; le sérum était rapidement recueilli, la coagulation du sang de Lapin s'effectuant très rapidement (*).

Après avoir décrit nos essais préliminaires, nous essayerons de montrer que les phénomènes observés sont réellement dus à l'action exercée par la ninhydrine et non à des réactions secondaires.

I. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Dans une série d'essais préliminaires, nous avons déterminé la concentration en ninhydrine qu'il faut utiliser pour obtenir un sérum qui reste, d'une part, limpide, d'autre part, faiblement coloré.

(*) Dans tous les cas, nous avons effectué nos expériences sur le sérum. Il faut surtout éviter d'opérer sur le plasma, car la ninhydrine, réagissant facilement avec le fibrinogène [39, 40], risquerait d'apporter des perturbations dans le phénomène que nous étudions.

A. — Concentration nécessaire pour que le sérum reste parfaitement limpide

Nous savons, en effet (Eggerth [67]), que la ninhydrine modifie considérablement la solubilité des protéines du sérum de Lapin; c'est ainsi qu'un précipité apparaît dès que l'on amène aux environs de *p*H 4,6 un sérum traité par ce réactif. Cette modification des protéines se produit très rapidement lorsque l'on met en jeu 10 mg de ninhydrine par cm^3 de sérum; elle se produit beaucoup plus lentement pour la dose de 1 mg de ninhydrine. Nous avons constaté encore qu'il n'est même pas nécessaire d'acidifier le sérum pour obtenir la précipitation d'une fraction protéidique : pour certaines doses de ninhydrine, en effet, une fraction protéidique précipite spontanément; la quantité de précipité ainsi formé dépend de la concentration en ninhydrine, de la température et de la durée d'action. Nous avons établi qu'en utilisant des doses de ninhydrine inférieures à 0,10 cm^3 d'une solution à 1 p. 100 dans l'eau physiologique par cm^3 de sérum de Lapin dilué au demi, nous obtenions des sérums qui conservaient leur limpidité pendant plus de douze heures. Ce temps se montre parfaitement compatible avec la durée des expériences immunologiques que nous décrirons plus loin.

B. — Concentration nécessaire pour que le sérum ne soit pas trop coloré

La ninhydrine, réagissant sur les protéines sériques, fait apparaître une coloration bleue (voir page 41). L'intensité et la vitesse d'apparition de cette coloration dépendent de plusieurs facteurs : *p*H, température, quantités de ninhydrine utilisée, nature de la protéine, présence de substances inhibitrices. Nous avons constaté que la ninhydrine, agissant dans les conditions que nous venons de décrire, fait apparaître une coloration bleue peu intense et toutefois insuffisante pour gêner l'appréciation du phénomène de floculation.

II. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION DU SYSTÈME SÉRUM DE CHEVAL-ANTISÉRUM DE LAPIN.

En utilisant la technique de Dean et Webb [49] (*), nous avons tout d'abord déterminé les proportions de sérum de Cheval et d'antisérum de Lapin correspondant au temps minimum de floculation (zone des proportions optima) : ce mélange correspond à 1 cm³ d'immunsérum de Lapin et à 1 cm³ de sérum de Cheval (antigène) dilué au 1/8. Un tel mélange placé à 37° C flocule en vingt-cinq minutes. Le même mélange dans lequel l'immunsérum a préalablement été traité par la ninhydrine (**) flocule beaucoup plus rapidement, en deux minutes. L'augmentation de la vitesse de floculation est donc d'environ 60 p. 100.

Nous nous sommes alors demandée si cette constatation ne devait pas être rattachée à un phénomène purement physico-chimique et non immunologique. Nous avons donc réalisé une nouvelle série d'essais en vue d'étudier la spécificité du phénomène.

III. — SPÉCIFICITÉ DU PHÉNOMÈNE

Afin de prouver qu'il s'agit bien d'une floculation spécifique et non de la précipitation d'une fraction protéidique de l'immunsérum ninhydrinisé ou encore du sérum antigène, nous avons placé au bain-marie à 37° C le sérum de Cheval et l'immunsérum de Lapin traités ou non par la ninhydrine, et nous avons noté l'aspect des échantillons après des temps variables.

Le tableau I résume nos observations.

(*) On trouvera une description détaillée de cette technique dans Boyd [24] et Neuzil [183].

(**) On fait agir la ninhydrine en solution à 1 p. 100 sur le sérum dilué au demi, pendant une demi-heure à 37° C (0,3 cm³ de solution pour 2 cm³ de sérum au demi) ; on complète ensuite la dilution pour l'amener au quart. Le témoin est traité d'une manière identique, mais l'eau physiologique remplace la solution de ninhydrine.

TABLEAU I

Echantillons laissés au bain-marie a 37° C	Observations
Sérum de Lapin anti-Cheval dilué.	Aucune modification après vingt-quatre heures.
Sérum de Lapin anti-Cheval traité par la ninhydrine.	Aucune modification après douze heures. Très léger précipité après vingt-quatre heures.
Sérum de Lapin non immun.	Aucune modification après vingt-quatre heures.
Sérum de Lapin non immun. traité par la ninhydrine.	Aucune modification après douze heures. Très léger précipité après vingt-quatre heures.
Sérum de Cheval ordinaire.	Aucune modification après vingt-quatre heures.
Sérum de Cheval ordinaire traité par la ninhydrine.	Aucune modification après douze heures. Très léger précipité après vingt-quatre heures.

N. B. — Les dilutions correspondent à celles mises en jeu dans nos expériences immunologiques, et le traitement à la ninhydrine a été effectué dans les mêmes conditions que précédemment.

Nous constatons ainsi, dans tous les échantillons, qu'il ne se produit aucune précipitation après douze heures. Il apparaît simplement un très léger précipité, après vingt-quatre heures, dans les échantillons traités par la ninhydrine. Or, les temps de floculation que nous avons mesurés étaient tous inférieurs à douze heures. En utilisant une dose plus faible de ninhydrine, 0,05 cm^3 de solution à 1 p. 100 pour 2 cm^3 de sérum dilué au demi, on peut éviter l'apparition de ce précipité même après vingt-quatre heures; malgré cela, l'augmentation de la vitesse de floculation du système sérum de Cheval - antisérum de Lapin se montre encore très sensible. Le phénomène que nous avons observé présente donc bien un caractère de spécificité immunologique.

IV. — ESSAIS SUR DIVERS SÉRUMS DE LAPIN ANTI-CHEVAL

Nous nous sommes demandée si l'action de la ninhydrine ne provenait pas d'une particularité du sérum de Lapin anti-Cheval ou encore du sérum de Cheval utilisé pour notre

première série d'expériences. Nous avons mis en jeu, d'une part, des sérums de Lapin anti-Cheval provenant de différents lapins, d'autre part, des sérums de Cheval provenant de différents chevaux. Nous avons toujours constaté que la ninhydrine produit une augmentation de la vitesse de floculation, ainsi que le montre le tableau II qui consigne nos résultats.

TABLEAU II

Anticorps	Antigène	Temps d'apparition de la primofloculation	
		Sérum témoin	Sérum « ninhydrinisé »
Sérum de Lapin n° 1 dilué au 1/8	Sérum de Cheval dilué au 1/32	3 minutes	instantané
Sérum de Lapin n° 2	Sérum de Cheval		
au 1/8	au 1/32	12 minutes	2 minutes
au 1/8	au 1/64	12 minutes	2 minutes
Sérum de Lapin n° 3	Sérum de Cheval		
au 1/8	au 1/32	17 minutes	1 minute
au 1/8	au 1/64	17 minutes	1 minute

Le sérum de Cheval total ne peut pas être considéré comme un antigène homogène, car les anticorps du sérum de Lapin correspondent aussi bien à la fraction albumine qu'à la fraction globuline contenues dans le sérum de Cheval (Oudin).

Afin de préciser avec un anticorps homogène les résultats précédemment établis, nous avons préparé de la sérum albumine et de la pseudoglobuline de Cheval. Ayant obtenu ces antigènes purifiés, nous avons pu préparer des sérums de Lapin antialbumines de Cheval et antipseudoglobulines de Cheval. Nous avons alors constaté que la ninhydrine exerce une action absolument comparable à celle que nous venons de décrire pour le sérum de Lapin antisérum de Cheval.

Nous décrirons plus loin l'action exercée par la ninhydrine sur d'autres immunsérums de Lapin (voir p. 61). Tous nos

résultats montrent que l'action de la ninhydrine n'est pas limitée au sérum de Lapin antisérum de Cheval ou antifractions protéidiques purifiées provenant du Cheval, mais à tous les immunsérums de Lapin, quel que soit l'antigène mis en jeu.

V. — NINHYDRINE ET TITRE EN ANTICORPS DES IMMUNSÉRUMS PRÉCIPITANTS

Dans les expériences précédemment exposées, nous avions remarqué que l'action de la ninhydrine sur l'anticorps ne semblait pas avoir déplacé la zone de primofloculation. Cette constatation nous permettait donc de conclure provisoirement que la ninhydrine ne modifie pas le titre en anticorps des précipitines.

Eggerth [67] ayant signalé que la ninhydrine modifie le titre en anticorps des agglutinines, nous avons cru opportun de revenir sur notre première constatation en comparant les primofloculations des immunsérums « ninhydrinisés » et celle des immunsérums témoins. Nous avons estimé cette étude essentielle, car les sérums de Lapins antiprotéines ou antitoxiques présentent généralement des zones de primofloculation assez large [105] ; de plus, l'hyperimmunisation à laquelle sont le plus souvent soumis les animaux de laboratoire provoque encore un élargissement de cette zone [105] ; nous avons constaté que la primofloculation se produit souvent dans deux tubes voisins, correspondant à des dilutions parfois très différentes du sérum de Cheval antigène : ainsi, pour le sérum de Lapin n° 3, par exemple, nous avons constaté que la primofloculation se produit en même temps pour la dilution au 1/32 et au 1/64 du sérum de Cheval; il en est de même pour le sérum de Lapin n° 2. Une légère modification du titre en anticorps aurait donc pu se produire et passer inaperçue. Afin de remédier à cet inconvénient, nous avons effectué de nouvelles expériences en utilisant, pour nos titrations, des dilutions d'antigène beaucoup plus rapprochées.

Le tableau III indique les mélanges que nous avons effectués avec le sérum de Lapin non traité (témoin) et avec le sérum de Lapin traité par la ninhydrine.

TABLEAU III

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8
Sérum de Lapin dilué au 1/8 (cm^3).	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sérum de Cheval dilué au 1/32 (cm^3)	0,50	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10

Avec l'immunsérum de Lapin non traité, nous constatons que les tubes 3 et 4 floculent les premiers (en trente-deux minutes) ; les autres floculent plus tard. Avec l'immunsérum de Lapin préalablement traité par la ninhydrine, les tubes 3 et 4 floculent également les premiers (en huit minutes) ; les autres, comme dans le cas précédent, floculent plus tardivement. Nous avons répété cette expérience avec d'autres immunsérums. Nos résultats ont toujours parfaitement concordé. Nous voyons donc que l'action de la ninhydrine ne modifie nullement le titre en anticorps de l'immunsérum traité.

VI. — ÉTUDE DE LA ZONE DE FLOCULATION DES IMMUNSÉRUMS TRAITÉS PAR LA NINHYDRINE

Dans nos tout premiers essais, nous avons constaté que la zone de floculation du sérum « ninhydrinisé » était plus étendue que celle du sérum témoin. Nous avons étudié en détail ce phénomène. Pour cela, nous avons utilisé dans deux séries d'expériences du sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval (*) et du sérum de Lapin antidiphtérique.

Au lieu de mettre en œuvre 0,20 cm^3 de ninhydrine, comme dans les expériences précédentes, nous avons utilisé une dose plus faible, afin de pouvoir suivre plus longtemps l'expérience et d'éviter surtout l'interférence éventuelle de la précipitation d'une fraction protéidique.

Les tableaux IV et V rendent compte des mélanges que nous avons réalisés et des résultats obtenus dans deux de nos expériences.

(*) Voir page 64.

TABLEAU IV

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pseudoglobulines de Cheval (1 cm³) : dilution de la solution à 5 p. 100.	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Sérum de Lapin antipseudoglobulines (cm³).....	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Temps de floculation de l'immunsérum normal (minutes).....	∞	∞	∞	∞	360	75	45	45	64	125	265	∞
Temps de floculation de l'immunsérum ninhydrinisé (minutes)..	∞	∞	∞	360	200	50	25	25	40	75	210	330

TABLEAU V

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Toxine diphtérique à 50 unités (1 cm³) : dilution de la solution ..	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Temps de floculation avec l'immunsérum normal (minutes) ..	∞	450	110	80	80	120	230	400	∞	∞	∞	∞
Temps de floculation avec l'immunsérum ninhydrinisé (minutes)	∞	118	52	35	35	50	80	240	590	20 h.	∞	∞
Sérum antidiphtérique de Lapin au 1/2 (titrant 10 unités)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

N. B. — Les précipités deviennent de plus en plus fins et difficiles à observer au fur et à mesure que l'on s'écarte de la zone des proportions optima. Les dilutions de l'anticorps vont de 1 à 1/2.048; le signe ∞ signale qu'il n'est plus possible d'observer un floculat.

Ces divers essais quantitatifs, auxquels correspondent les figures 3 et 4, permettent les constatations suivantes :

a) La ninhydrine ne modifie pas la « zone des proportions optima », car les temps de floculation des sérums ninhydrinisés de même que les temps de floculation des sérums « témoins » sont minima dans cette zone;

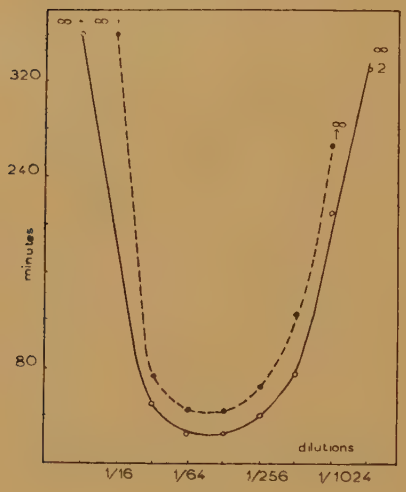


Fig. 3.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation des mélanges pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin, en fonction du taux de dilution des pseudoglobulines de Cheval.
La courbe en pointillé correspond au mélange antigène - anticorps. La courbe 2 correspond au mélange antigène - anticorps traité par la ninhydrine.

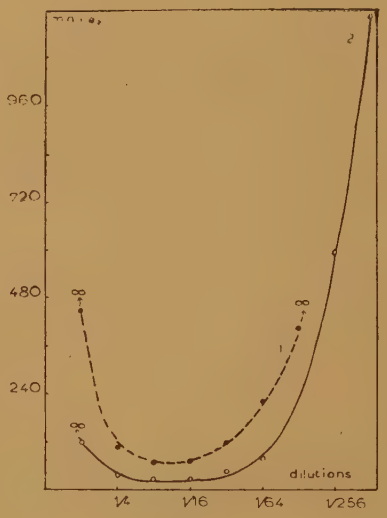


Fig. 4.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation des mélanges sérum de Lapin anti-diphtérique - toxine diphtérique, en fonction du taux de dilution de la toxine.
La courbe en pointillé correspond au mélange sérum de Lapin anti-diphtérique - toxine diphtérique. La courbe 2 correspond au mélange toxine - sérum de Lapin antidiphtérique traité par la ninhydrine.

b) Il se produit un élargissement de la zone de floculation de part et d'autre de la zone des proportions optima;

c) L'accélération (vitesse de floculation des sérums « témoins » - vitesse de floculation des sérums « ninhydrinisés ») est plus faible dans la zone des proportions optima et croît de part et d'autre de cette zone.

Si nous étudions les temps de floculation des immunsérums

en fonction des dilutions des antigènes, nous constatons que les courbes correspondantes présentent approximativement le même aspect; les sommets des courbes correspondant aux sérums « ninhydrinisés » sont plus élargis. Les courbes de l'accélération présentent également la même allure (fig. 3 et 4).

L'analyse du tableau et des courbes montre que l'élargissement de la zone de floculation n'évolue pas de la même façon suivant le système immunologique envisagé.

Si la ninhydrine agissant sur le sérum de Lapin antipseudoglobulines ou le sérum de Lapin antidiphtérique provoque un élargissement de la zone de floculation dans la zone d'excès d'anticorps, il n'en est pas de même dans la zone d'excès d'antigène. En effet :

a) Le sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval (au 1/8) flocule en trente-six minutes pour la dilution 1/16 de l'antigène correspondant, tandis que le sérum de Lapin « ninhydrinisé » flocule en trois cent soixante minutes pour la dilution au 1/8 de l'antigène;

b) Le sérum de Lapin antidiphtérique (au demi) flocule en quatre cent cinquante minutes pour la dilution au demi de l'antigène correspondant, tandis que le sérum de Lapin « ninhydrinisé » flocule en cent dix-huit minutes pour la dilution au demi de l'antigène.

Nous constatons que la zone de floculation a été élargie dans le premier cas, tandis que, dans le second cas, la limite de floculation est simplement atteinte plus rapidement.

Ces constatations s'expliquent fort bien. La floculation se trouvant fortement accélérée sous l'influence de la ninhydrine, on conçoit que les différences entre les temps de floculation des divers mélanges se trouvent ainsi réduits par rapport au témoin, d'où l'élargissement de la zone de floculation.

On conçoit également très bien que la ninhydrine agisse différemment sur les deux systèmes que nous avons étudiés : dans le premier cas, l'antigène et l'anticorps ont un poids moléculaire voisin; dans le second cas, ils présentent un poids moléculaire assez éloigné (*), on comprend donc que, dans ce dernier cas, les variations se montrent plus sensibles du côté de la zone d'excès d'anticorps.

(*) Le poids moléculaire de la toxine diphtérique est d'environ 74.000 [194, 205]. Les poids moléculaires des différentes catégories de globulines sont beaucoup plus élevés. Ils varient de 200.000 à 300.000 pour les α-globulines, de 90.000 à 1.300.000 pour les β-globulines, de 156.000 à 300.000 pour les γ-globulines (voir, à ce sujet, Haurowitz [98]).

VII. — ACTION DE LA NINHYDRINE ET LOI DES PROPORTIONS OPTIMA

Nous avons utilisé, dans cette expérience, du sérum de Lapin anti-Cheval. Pour un système immunologique déterminé, le rapport de la dilution de l'immunsérum à la dilution de l'antigène est constant pour les mélanges donnant la primofloculation, autrement dit s'il se produit une primofloculation pour le sérum dilué au 1/8 et l'antigène dilué au 1/16, il doit se produire une primofloculation pour le sérum dilué au 1/16 et l'antigène dilué au 1/32. Ayant prouvé précédemment que la ninhydrine ne modifie pas le titre du sérum de Lapin anti-Cheval, nous avons pensé que la loi des proportions optima devait être également respectée. Il restait néanmoins à le vérifier.

Nous avons mis en jeu un immunsérum de Lapin, dont la dilution au demi sature exactement un même volume de sérum de Cheval dilué au 1/16 (témoin : zone des proportions optima). Nous avons ensuite calculé la dilution à pratiquer sur l'immunsérum de Lapin « ninhydrinisé » ou non, pour neutraliser exactement des dilutions plus grandes de l'antigène. Le tableau VI indique les résultats que nous avons obtenus.

TABLEAU VI

Sérum de Cheval antigène (1 cm³) — Dilution utilisée	Sérum de Lapin anti-Cheval normal (1 cm³)		Sérum de Lapin anti-Cheval « ninhydrinisé » (1 cm³)	
	Dilution correspondant à la primo-floculation	Temps de floculation (minutes)	Dilution correspondant à la primo-floculation	Temps de floculation (minutes)
1/16	1/2	5	1/2	3
1/32	1/4	16	1/4	5
1/64	1/8	36	1/8	8
1/128	1/16	100	1/16	17
1/256	1/32	plus de 24 heures	1/32	180

L'examen de ces résultats montre que, si la loi des proportions optima est respectée avec l'immunsérum normal, phéno-

mène connu, elle est également valable pour l'immunsérum « ninhydrinisé » puisque les dilutions, dans le second cas, sont exactement les mêmes que dans le premier.

De plus, la ninhydrine déplace la limite de précipitation : en effet, au fur et à mesure que l'on dilue l'anticorps, les précipités deviennent de plus en plus fins. Pour la dilution au 1/32, avec le sérum de Lapin anti-Cheval non traité, il n'est plus possible de déceler un précipité en vingt-quatre heures, tandis que le même échantillon traité par la ninhydrine floculе encore en trois heures. Le déplacement de la limite de précipitation est très certainement une conséquence de l'élargissement de la zone de précipitation.

VIII. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR L'ANTIGÈNE

Dans toutes les expériences que nous venons d'exposer, nous avons traité l'anticorps par la ninhydrine; il nous a semblé intéressant de rechercher si le traitement de l'antigène par ce réactif conduisait à des résultats identiques. Mettant en œuvre le sérum de Lapin anti-Cheval, nous avons effectué de nouveaux essais comparatifs, dans lesquels soit l'antigène seul, soit l'anticorps seul, soit l'antigène et l'anticorps avaient été traités par la ninhydrine. Nous avons pris soin de ramener préalablement les sérums antigène et anticorps au même titre en protéines. Nous avons utilisé la dose de 0,20 cm^3 de ninhydrine pour 2 cm^3 de sérum au demi, pendant une demi-heure à 37° C, puis complété la dilution au 1/8 dans les deux cas.

Nous effectuons quatre série d'essais :

1° Sérum de Cheval normal - sérum de Lapin anti-Cheval normal;

2° Sérum de Cheval traité par la ninhydrine - sérum de Lapin traité par la ninhydrine;

3° Sérum de Lapin traité par la ninhydrine - sérum de Cheval normal;

4° Sérum de Lapin normal - sérum de Cheval traité par la ninhydrine.

Voici, pour l'échantillon correspondant aux proportions optima, les divers temps de floculation :

Sérum de Cheval normal + sérum de Lapin normal : quarante-huit minutes;

Sérum de Cheval « ninhydrinisé » + sérum de Lapin « ninhydrinisé » : neuf minutes;

Sérum de Cheval normal + sérum de Lapin « ninhydrinisé » : treize minutes;

Sérum de Cheval « ninhydrinisé » + sérum de Lapin normal : trente-neuf minutes.

Nous constatons que, dans tous les cas, la ninhydrine produit une accélération de la floculation sans déplacer le titre en anticorps; l'accélération produite est faible lorsque l'antigène seul est traité par la ninhydrine, elle est plus élevée lorsque l'anticorps seul est traité par ce réactif. Enfin, elle est maximum lorsque l'antigène et l'anticorps ont été « ninhydrinisés ».

IX. — ROLE ÉVENTUEL JOUÉ PAR LE PIGMENT BLEU DANS L'ACCÉLÉRATION DU POUVOIR FLOCULANT DES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN.

Nous aurons l'occasion, dans les pages qui vont suivre, de tenter une explication sur le mode d'action exercé par la ninhydrine sur les anticorps. Cependant, avant d'aborder ce sujet, il était opportun de rechercher si le pigment bleu qui se forme lorsque l'on fait agir la ninhydrine sur les protéines [228, 229] ne jouait pas un rôle dans le phénomène immunologique que nous venons de décrire.

Dans un essai préliminaire, nous avons vérifié qu'il est possible d'éliminer le colorant bleu par dialyse contre de l'eau physiologique à *p*H 7, fréquemment renouvelée pendant vingt-quatre heures, lorsque la dose de ninhydrine est faible. Il est nécessaire, dans cet essai, d'utiliser une faible dose de ninhydrine, afin d'éviter la précipitation d'une fraction protéidique qui viendrait interférer avec le phénomène immunologique [67].

Nous avons ainsi dialysé :

1° Du sérum de Lapin antidiphtérique dilué au 1/8 avec de l'eau physiologique;

2° Du sérum de Lapin antidiphtérique auquel nous avons ajouté 0,10 cm^3 de solution de ninhydrine à 1 p. 100, pour 3 cm^3 dilués au 1/3, la ninhydrine ayant agi pendant une demi-heure à 37° C, nous avons enfin ajusté la dilution au 1/8.

3° Nous avons préparé de la même façon du sérum de Lapin antidiphtérique « ninhydrinisé », mais non dialysé. Nous avons effectué nos titrations selon la méthode de Dean et Webb. Voici nos résultats :

Le sérum de Lapin antidiphtérique dialysé floculе en vingt-cinq minutes.

Le sérum de Lapin antidiphtérique « ninhydrinisé » et dialysé floculе en cinq minutes.

Le sérum de Lapin « ninhydrinisé », non dialysé, floculе en cinq minutes.

Le sérum de Lapin « non dialysé » floculе en vingt-cinq minutes.

Les résultats montrent que l'élimination du colorant bleu, après action de la ninhydrine sur les protéines sériques, n'influence pas les effets de ce réactif sur le sérum de Lapin antidiphtérique. Nous verrons ultérieurement qu'il est possible de confirmer ce résultat.

Eggerth a d'ailleurs montré [67] que les modifications physicochimiques que la ninhydrine fait subir aux protéines sériques se montrent indépendantes de la coloration bleue.

X. — ROLE DES ACIDES AMINÉS LIBRES DES IMMUNSÉRUMS

Il reste enfin un dernier facteur qu'il importe d'envisager, c'est la présence d'aminoacides dans les immunsérums qui, on le sait [228, 229], réagissent avec la ninhydrine. Il était intéressant de savoir si les aldhédydes formés n'intervenaient pas dans le phénomène. A cet effet, nous avons recommencé nos expériences, en opérant sur des sérums privés de leurs aminoacides par dialyse prolongée. Nous avons alors constaté que ces aminoacides ne jouaient absolument aucun rôle, la dialyse n'apportant aucune modification au phénomène.

XI. — EXTENSION DU PHÉNOMÈNE A DIVERS IMMUNSÉRUMS DE LAPIN

Au cours de notre étude préliminaire, nous avons généralement utilisé comme antigène le sérum de Cheval. Nous avons mis en jeu également les pseudoglobulines de Cheval et la toxine diphtérique. Nous avons cherché à savoir si le phénomène que nous avons décrit pouvait être généralisé et, pour cela, nous avons utilisé différents antigènes et toujours le Lapin comme donneur d'anticorps.

Nous avons étudié les antigènes suivants :

La sérum albumine de Cheval;

La pseudoglobuline de Cheval;
La pseudoglobuline de Mouton;
L'ovalbumine;
L'albumine de Cheval cristallisée;
L'ovalbumine cristallisée;
La toxine diphtérique;
La toxine ascaridienne;
Le polyholoside du pneumocoque.

Dans toutes nos expériences, nous avons fait agir la ninhydrine sur le sérum dilué ou non pendant une demi-heure à 37° C; les titrations ont été effectuées comme d'habitude par la méthode de Dean et Webb. Dans chaque expérience, nous avons effectué un essai témoin, dans lequel la ninhydrine avait été simplement remplacée par de l'eau physiologique.

Dans le tableau VII se trouvent consignés les systèmes que nous avons étudiés et les résultats obtenus. Les chiffres correspondent à la zone des proportions optima.

1° Dans tous les cas, la ninhydrine, ayant préalablement agi sur l'anticorps, augmente la vitesse de floculation du système;

2° Dans tous les cas, où il était possible d'observer une zone de primofloculation, nous n'avons jamais noté de modification du titre en anticorps : c'est d'ailleurs pourquoi nous

TABLEAU VII

Proportion d'antigène et d'anticorps correspondant à la primofloculation		Dose de ninhydrine à 1 p. 100 agissant pendant 1/2 h. à 37°	Temps d'apparition de la floculation		Aspect de la primo-floculation
Antigènes	Anticorps de Lapin		Sérums témoins	Sérums ninhydrinisés	
Sérum de Cheval total : 1 cm³ dilué au 1/32	Sérum de Lapin anti-Cheval : 1 cm³ dilué au 1/8	0,20 cm³ pour 2 cm³ dilué au 1/2	12 minutes	2 minutes	zone
Pseudo-globulines de Cheval (***) : 1 cm³ dilué au 1/64	Sérum de Lapin antipseudo-globulines : 1 cm³ dilué au 1/8	0,20 cm³ pour 1 cm³	32 minutes	17 minutes	zone
Albumines de Cheval : 1 cm³ dilué 1/128 ou 1/256	Sérum de Lapin antialbumines : 1 cm³ dilué au 1/8	0,20 cm³ pour 1 cm³	7 minutes	2 minutes	zone

TABLEAU VII *(suite)*

Proportion d'antigène et d'anticorps correspondant à la primofloculation		Dose de ninhydrine à 1 p. 100 agissant pendant 1/2 h. à 37°	Temps d'apparition de la floculation		Aspect de la primo-floculation
Antigènes	Anticorps de Lapin		Sérums témoins	Sérums ninhydrinisés	
Pseudoglobulines de Mouton : 1 cm³ dilué au 1/8	Sérum de Lapin antipseudoglobulines de Mouton : 1 cm³ dilué au 1/8	0,20 cm³ pour 3 cm³	32 minutes	11 minutes	zone
Ovalbumines préparées selon la technique de Pérez [v. 150] (*) : 1 cm³ non dilué	Sérum de Lapin antiovalbumines : 1 cm³ dilué au 1/16	0,20 cm³ pour 1 cm³	40 minutes	20 minutes	pas de zone
Ovalbumines préparées selon la technique de Kekwick et Cannan [126] (*) : 1 cm³ non dilué	Sérum de Lapin antiovalbumines : 1 cm³ dilué au 1/16	0,20 cm³ pour 1 cm³	30 minutes	10 minutes	pas de zone
Albumine cristallisée [v. 150] (**) : 1 cm³ non dilué	Sérum de Lapin antialbumine cristallisée : 1 cm³	0,20 cm³ pour 1 cm³	il se forme un anneau	il se forme un anneau plus rapidement	pas de zone
Ovalbumine cristallisée [v. 150] (**) : 1 cm³ non dilué	Sérum de Lapin antiovalbumine cristallisée : 1 cm³	0,10 cm³ pour 1 cm³	il se forme un anneau	il se forme un anneau plus rapidement	pas de zone
Toxine diphtérique (à 47 unités) : 0,05 cm³	Sérum de Lapin antidiphtérique : 0,74 cm³ dilué au 1/4	0,40 cm³ pour 2 cm³ dilué au 1/2	2 heures	30 minutes	zone
Toxine ascaridienne (****) : 0,50 cm³ dilué au 1/10	Sérum de Lapin anti-Ascaris : 0,50 cm³ non dilué	0,10 cm³ pour 1 cm³	45 minutes	10 minutes	zone
Polyholoside du pneumocoque (0,031 mg. dans 1 cm³)	Sérum de Lapin antipolyholoside : 1 cm³ dilué au 1/4	0,20 cm³ pour 1 cm³	45 minutes	11 minutes	zone

(*) Le système ovalbumine-antisérum de Lapin flocule quelle que soit sa dilution (à condition toutefois de ne pas dépasser la dilution 1/32) ; cependant, la floculation est plus rapide avec l'ovalbumine non diluée qu'avec l'ovalbumine diluée au demi ou au tiers ; l'action de la ninhydrine respecte cet ordre, mais augmente la vitesse de floculation de tous les mélanges.

ne rapportons, dans le tableau précédent, que les chiffres correspondant à la primofloculation;

3° Pour les systèmes qui ne présentent pas de zone de floculation, nous n'avons jamais observé de modification des conditions de dilutions nécessaires à la primofloculation.

CONCLUSIONS DU PREMIER CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums précipitants de Lapin, et nous avons montré qu'après action de ce réactif (solution à 1 p. 100, une demi-heure à 37° C), l'immunsérum flocule beaucoup plus rapidement lorsqu'on le met en présence de son antigène.

En étudiant un certain nombre d'antigènes (sérum de Cheval, sérum albumines de Cheval, pseudoglobulines de Mouton, ovalbumines, polyholoside du pneumocoque, toxine diphtérique, toxine ascaridienne, etc.), nous avons mis en évidence la généralité du phénomène.

Nous avons encore montré que cette constatation devait être rattachée à l'action de la ninhydrine sur l'anticorps, car le pigment bleu formé et les aminoacides libres du sérum n'interviennent nullement dans le phénomène.

Après action de la ninhydrine, l'immunsérum a conservé son titre en anticorps et sa spécificité.

Mettant en jeu des techniques physiques variées, nous allons essayer de tenter une interprétation de ce phénomène, mais auparavant nous avons cherché à savoir si les immunsérums d'autres animaux se conduisaient comme les immunsérums de Lapin; à cet effet, nous avons étudié les immunsérums de Cheval.

(**) Les albumines cristallisées et les ovalbumines cristallisées que nous avons utilisées n'étaient pas suffisamment concentrées pour provoquer la formation, chez le Lapin, d'un antisérum de titre assez élevé. C'est pourquoi nous avons utilisé la technique de l'anneau; après action de la ninhydrine sur l'anticorps, l'anneau apparaît beaucoup plus rapidement. (On trouvera des détails sur la technique de l'anneau dans l'ouvrage de Bordet [20].)

(***) Les pseudoglobulines de Cheval et de Mouton ont été préparées par la technique de Marcus [167] : dialyse de la solution de globulines obtenues selon Hofmeister [113].

(****) La toxine ascaridienne a été préparée selon une méthode qui consiste à laisser macérer à la glacière des ascaris dans de l'eau physiologique pendant quarante-huit heures; les ascaris sont alors broyés puis délayés dans de l'eau physiologique. Une centrifugation fournit des eaux-mères riches en toxine qu'il convient d'utiliser rapidement.

CHAPITRE II

NINHYDRINE ET TEMPS DE FLOCULATION. ACTION SUR LE SÉRUM DE CHEVAL

Après avoir étudié l'action de la ninhydrine sur différents systèmes immunologiques, dont l'anticorps provenait toujours du Lapin, nous avons cherché à savoir si cette action s'étendait aux anticorps provenant d'autres espèces animales. Nous avons utilisé alors l'immunsérum de Cheval.

I. — ESSAIS PRÉLIMINAIRES

Comme pour le sérum de Lapin, la ninhydrine, agissant sur le sérum de Cheval, fait apparaître une coloration bleue et modifie la solubilité des protéines.

Nous avons déterminé pour le sérum de Cheval la concentration en ninhydrine qu'il faut utiliser pour obtenir un sérum, d'une part parfaitement limpide, d'autre part faiblement coloré. Nous avons alors constaté qu'en utilisant des doses de solution de ninhydrine à 1 p. 100 comprises entre 0,05 et 0,15 cm^3 par cm^3 de sérum de Cheval au demi, nous obtenions un milieu parfaitement limpide pendant un temps supérieur à douze heures; la coloration bleue apparue dans ces conditions ne gêne nullement l'appréciation de la primofloculation. Remarquons que la dose de ninhydrine utilisée ici est plus élevée que celle mise en jeu avec le sérum de Lapin; d'autre part, la coloration est plus pâle que celle obtenue avec le sérum de Lapin, mais tend davantage vers le violacé.

II. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LA VITESSE DE FLOCULATION DU SYSTÈME SÉRUM DE CHEVAL ANTIDIPHTÉRIQUE - TOXINE DIPHTÉRIQUE.

On fait agir la ninhydrine (*) en solution à 1 p. 100 sur le sérum antidiphtérique dilué au demi; le mélange est laissé à l'étuve à 37° C pendant une demi-heure, puis on complète la dilution au tiers par addition d'eau physiologique. Un échantillon identique du même immunsérum est traité de la même façon, mais cette fois la solution de ninhydrine est remplacée par de l'eau physiologique (témoin). Chacun de ces deux échantillons est alors mis en présence de toxine diphtérique.

Grâce à la technique de Ramon [216] (**), nous avons tout d'abord déterminé les proportions de toxine diphtérique et de sérum de Cheval antidiphtérique correspondant au temps minimum de floculation (zone des proportions optima) : ce mélange correspond à 0,50 cm³ de sérum de Cheval antidiphtérique (titrant 312 unités par cm³) dilué au tiers, et à 1 cm³ de toxine diphtérique (titrant 50 unités par cm³). Un tel mélange placé au bain-marie à 37° C flocule en quarante minutes. Le même mélange dans lequel l'immunsérum a préalablement été traité par la ninhydrine flocule beaucoup plus lentement, en cent vingt-trois minutes. Ce retard de la floculation est donc d'environ 207 p. 100.

Nous nous sommes demandée également ici si cette constatation ne devait pas être rattachée à un phénomène purement physicochimique et non immunologique. Nous avons donc réalisé une nouvelle série d'essais en vue d'étudier la spécificité du phénomène.

III. — SPÉCIFICITÉ DU PHÉNOMÈNE

Afin de prouver qu'il s'agit bien d'une floculation spécifique et non de la précipitation d'une fraction protéidique de l'immunsérum ninhydrinisé ou encore du sérum antigène, nous avons placé au bain-marie à 37° C le sérum de Cheval

(*) On utilise 0,30 cm³ de solution de ninhydrine pour 2 cm³ de sérum antidiphtérique dilué au demi.

(**) On trouvera une description détaillée de cette technique dans les ouvrages de Boyd [24], Kabat et Mayer [123] et Neuzil [183].

antidiphtérique et la toxine diphtérique traités ou non par la ninhydrine, et nous avons noté l'aspect des échantillons après des temps variables.

Le tableau VIII résume nos résultats.

TABLEAU VIII

Echantillons laissés au bain-marie a 37° C	Observations
Sérum de Cheval antidiphtérique dilué.	Aucune modification après vingt-quatre heures.
Sérum de Cheval antidiphtérique traité par la ninhydrine.	Aucune modification après douze heures. Très léger précipité après vingt-quatre heures.
Sérum de Cheval non immun.	Aucune modification après vingt-quatre heures.
Sérum de Cheval non immun traité par la ninhydrine.	Aucune modification après douze heures. Très léger précipité après vingt-quatre heures.
Toxine diphtérique.	Aucune modification après vingt-quatre heures.
Toxine diphtérique traitée par la ninhydrine.	Aucune modification après douze heures. Très léger précipité après vingt-quatre heures.

N. B. — Les dilutions correspondent à celles mises en jeu dans nos expériences immunologiques, et le traitement à la ninhydrine a été effectué dans les mêmes conditions que précédemment.

Nous voyons qu'après douze heures aucun des échantillons étudiés n'a subi de modifications apparentes; or, les temps de floculation que nous avons mesurés sont toujours inférieurs à douze heures. Le phénomène que nous avons observé est donc bien un phénomène spécifique. Signalons qu'en diminuant la dose de ninhydrine mise en jeu (0,05 cm^3 de solution à 1 p. 100 par cm^3 de sérum dilué au demi), on peut empêcher la moindre précipitation même après vingt-quatre heures; le phénomène immunologique reste cependant très net.

IV. — ESSAIS SUR DIVERS SÉRUMS ANTIDIPHTÉRIQUES DE CHEVAL

Nous nous sommes demandée si l'action de la ninhydrine ne provenait pas d'une particularité du sérum de Cheval antidiphtérique ou encore de la toxine diphtérique utilisée pour notre première série d'expériences. Nous avons mis en jeu, d'une part, différents sérums de Cheval antidiphtériques, d'autre part différentes toxines diphtériques.

Nous avons toujours constaté que la ninhydrine produit un retard de la floculation, ainsi que le montre le tableau IX qui consigne deux de nos résultats.

TABLEAU IX

Anticorps	Antigène	Temps d'apparition de la primofloculation	
		Sérum témoin	Sérum « ninhydrinisé »
Sérum de Cheval antidiphtérique (à 312 unités par cm^3) dilué 1/8 : 0,50 cm^3	Toxine diphtérique (à 50 unités par cm^3) 1 cm^3	40 minutes	123 minutes
Sérum de Cheval antidiphtérique (à 300 unités par cm^3) dilué 1/2 : 0,16 cm^3	Toxine diphtérique (à 42 unités par cm^3) diluée 1/2 : 1 cm^3	16 minutes	31 minutes

V. — NINHYDRINE ET TITRE EN ANTICORPS DES IMMUNSÉRUMS PRÉCIPITANTS

Dans les expériences que nous venons d'exposer, nous avions remarqué que l'action de la ninhydrine sur l'anticorps ne semblait pas avoir déplacé la zone de primofloculation. Afin de préciser cette constatation, nous avons comparé la primofloculation des immunsérums « ninhydrinisés » et celle des immunsérums témoins (*), en mettant en jeu des quantités

(*) Les sérums de Cheval antitoxiques (tels que les sérums de Cheval antidiphtérique) ou antiprotéines (tels que les sérums de Cheval anti-albumine) présentent des zones de floculation beaucoup plus étroites

très voisines de sérum de Cheval antidiphtérique. Le tableau X indique les mélanges que nous avons effectués.

TABLEAU X

Tubes	1	2	3	4	5	6
Sérum de Cheval antidiphtérique (à 312 unités) dilué au 1/3 (cm^3)	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54
Toxine diphtérique (à 50 unités) (cm^3)	1	1	1	1	1	1

Avec l'immunsérum de Cheval non traité, on constate que le tube n° 3 floculе le premier (en trente-huit minutes), les autres floculent plus tard. Avec l'immunsérum de Cheval préalablement traité par la ninhydrine, on constate que le tube n° 3 floculе également le premier (en cent vingt minutes). Les autres tubes, comme dans le cas précédent, floculent plus tardivement.

Nous avons répété cette expérience avec d'autres immunsérums de Cheval : nos résultats ont toujours parfaitement concordé. Nous voyons donc que l'action de la ninhydrine ne modifie nullement le titre en anticorps de l'immunsérum traité.

VI. — ÉTUDE DE LA ZONE DE FLOCULATION DES IMMUNSÉRUMS TRAITÉS PAR LA NINHYDRINE

Dans les essais concernant les immunsérums de Lapin, nous avons constaté que la zone de floculation des sérums « ninhydrinisés » était plus étendue que celle des sérums témoins. En est-il ainsi lorsque les immunsérums proviennent du Cheval ? Nous avons étudié en détail ce phénomène au moyen de sérum de Cheval antidiphtérique et de toxine diphtérique; nous avons utilisé la dose de ninhydrine habituelle (0,30 cm^3 d'une solution à 1 p. 100 pour 2 cm^3 de sérum dilué au demi).

---

que la plupart des immunsérums de Lapin. Cette zone est cependant plus large lorsqu'il s'agit de sérums de Cheval antipolyholosides du pneumocoque [32]; l'hyperimmunisation peut aussi provoquer un élargissement de la zone de primofloculation des immunsérums de Cheval [111].

Cette dose permet, en effet, d'étudier l'apparition de la floculation dans les zones d'inhibition en fonction du temps, car elle ne provoque pas de précipitation de fractions protéidiques pendant une durée supérieure à douze heures. Le tableau XI rend compte des mélanges que nous avons effectués et des résultats obtenus.

L'expérience illustrée par la figure 5 montre qu'après action de la ninhydrine, la zone de floculation se trouve rétrécie. Cet essai quantitatif nous permet les constatations suivantes :

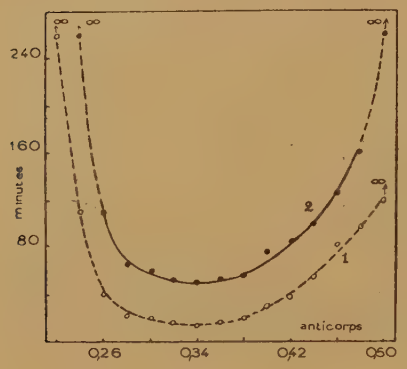


FIG. 5.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation des mélanges sérum de Cheval antidiphtérique - toxine diphtérique, en fonction de la quantité d'immunsérum (cm³) ajoutée à 0,50 cm³ de toxine diphtérique (technique de RAMON).
La courbe 1 correspond au mélange sérum de Cheval antidiphtérique-toxine diphtérique. La courbe 2 correspond au mélange sérum de Cheval antidiphtérique traité par la ninhydrine - toxine diphtérique.

a) Nous voyons encore une fois que la ninhydrine ne déplace pas le titre en anticorps du sérum antidiphtérique;

b) Il se produit un rétrécissement de la zone de floculation de part et d'autre de la zone des proportions optima;

c) Le retard paraît moindre dans la zone des proportions optima, il augmente de part et d'autre de cette zone. Si nous rapportons les temps de floculation de l'immunsérum en fonction des dilutions de l'antigène, nous constatons que les courbes obtenues présentent approximativement le même aspect (voir fig. 5).

VII. — ACTION DE LA NINHYDRINE ET LOI DES PROPORTIONS OPTIMA

Ayant vérifié que la ninhydrine ne modifie pas le titre du sérum antidiphtérique, nous avons cherché à savoir si la loi des proportions optima était vérifiée. Nous avons utilisé un sérum de Cheval antidiphtérique (à 300 unités par cm³) dont

TABLEAU XI

TUBES	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Sérum de Cheval antidiphtérique (à 350 unités) dilué au 1/4 (cm^3)	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50
Toxine diphtérique à 55 unités) (cm^3).....	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Eau physiologique à 9 p. 1000.	0,30	0,28	0,26	0,24	0,22	0,20	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	0
Temps de floculation avec l'immunsérum normal (en minutes)	op. 260	op. 260	112	40	22	20	18	14	16	20	30	38	55	82	98	120
Temps de floculation avec l'immunsérum ninhydrinisé (en minutes)..	op. 260	op. 260	op. 260	110	65	60	52	50	52	57	75	85	100	125	160	op. 260

N. B. — Les précipités deviennent de plus en plus fins et difficiles à observer au fur et à mesure que l'on s'écarte de la zone des proportions optima. Le signe op. signifie qu'il n'est pas possible d'observer un floculat, mais qu'il se produit toutefois une légère opalescence.

0,16 cm³ saturent exactement 1 cm³ de toxine diphtérique (à 50 unités par cm³ - témoin, zone des proportions optima). Nous avons ensuite calculé les dilutions qu'il faut apporter à l'immunsérum de Cheval « ninhydrinisé » ou non pour neutraliser exactement des dilutions plus grandes de l'antigène. L'examen de ces résultats montre que si la loi des proportions optima est respectée avec l'immunsérum normal, elle est également valable pour l'immunsérum « ninhydrinisé », puisque les dilutions dans le second cas sont exactement les mêmes que dans le premier.

VIII. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR L'ANTIGÈNE

Dans toutes les expériences que nous venons d'exposer, nous avons traité l'anticorps par la ninhydrine; nous avons voulu aussi rechercher si le traitement de l'antigène par ce réactif conduisait à des résultats identiques. Mettant en jeu le sérum de Cheval antidiphtérique, nous avons effectué de nouveaux essais comparatifs dans lesquels soit l'antigène seul, soit l'anticorps seul, soit l'antigène et l'anticorps avaient été traités par la ninhydrine.

Nous avons utilisé la dose de 0,30 cm³ de solution de ninhydrine à 1 p. 100 pour 1 cm³ de sérum agissant pendant une demi-heure à 37° C, puis nous avons complété la dilution au demi dans tous les cas.

Nous avons effectué quatre séries d'essais :

1° Toxine diphtérique - sérum de Cheval antidiphtérique;

2° Toxine diphtérique traitée par la ninhydrine - sérum de Cheval antidiphtérique traité par la ninhydrine;

3° Toxine diphtérique - sérum de Cheval antidiphtérique traité par la ninhydrine;

4° Toxine diphtérique traitée par la ninhydrine - sérum de Cheval antidiphtérique.

Voici, pour l'échantillon correspondant aux proportions optima, les divers temps de floculation :

1° Toxine diphtérique - sérum de Cheval antidiphtérique : seize minutes;

2° Toxine diphtérique « ninhydrinisée » - sérum de Cheval antidiphtérique « ninhydrinisé » : trente-trois minutes;

3° Toxine diphtérique - sérum de Cheval antidiphtérique « ninhydrinisé » : trente et une minutes;

4° Toxine diphtérique « ninhydrinisée » - sérum de Cheval antidiphtérique : vingt minutes.

Nous constatons que, dans tous les cas, la ninhydrine produit un retard de la floculation, sans déplacer d'ailleurs le titre en anticorps.

Le retard produit est plus faible lorsque l'antigène seul est traité par la ninhydrine; il est maximum lorsque l'antigène et l'anticorps ont été « ninhydrinisés ».

IX. — ROLE ÉVENTUEL JOUÉ PAR LE PIGMENT BLEU DANS LE POUVOIR FLOCULANT DES IMMUNSÉRUMS DE CHEVAL.

Nous avons dialysé du sérum de Cheval antidiphtérique, afin d'éliminer le composé bleu, et montré, en effectuant une série d'essais identiques à ceux que nous avons effectués avec le sérum de Lapin (voir chapitre premier), que l'élimination du colorant bleu, après action de la ninhydrine sur les protéines sériques, n'influence pas les propriétés immunologiques de ce réactif.

X. — ROLE DES ACIDES AMINÉS LIBRES DES IMMUNSÉRUMS

En éliminant les aminoacides par dialyse, nous avons montré (de la même façon que pour le sérum de Lapin) que ceux-ci n'interviennent pas dans l'action de la ninhydrine sur les immunsérums de Cheval.

XI. — EXTENSION DU PHÉNOMÈNE A DIVERS IMMUNSÉRUMS DE CHEVAL

Au cours de notre étude préliminaire, nous avons généralement utilisé comme antigène la toxine diphtérique. Nous avons cherché à savoir si le phénomène que nous avons décrit pouvait être généralisé : pour cela, nous avons mis en jeu différents antigènes en utilisant toujours le Cheval comme donneur d'anticorps.

Nous avons étudié les antigènes suivants : anatoxine diphtérique, toxine tétanique, toxine pesteuse, anatoxine botulique.

Dans toutes nos expériences, nous avons fait agir la ninhydrine sur le sérum dilué ou non, pendant une demi-heure à 37° C. Les titrations ont été effectuées comme d'habitude par la méthode de Ramon. Dans chaque expérience, nous avons

effectué un essai témoin dans lequel la solution de ninhydrine avait été simplement remplacée par de l'eau physiologique.

Dans le tableau XII se trouvent consignés les systèmes que nous avons étudiés et les résultats obtenus; les chiffres correspondent à la zone des proportions optima.

TABLEAU XII

Proportion d'antigène et d'anticorps correspondant à la primofloculation		Dose de ninhydrine à 1 p. 100 agissant pendant 1/2 h. à 37°	Temps d'apparition de la floculation		Aspect de la primo-floculation
Antigènes	Anticorps de Cheval		Sérums témoins	Sérums ninhydrinisés	
Toxine diphtérique (à 55 unités par cm³) : 0,50 cm³	Sérum de Cheval antidiphtérique (312 unités par cm³) dilué au 1/3 : 0,48 cm³	0,30 cm³ pour 2 cm³ dilué au 1/2	38 minutes	120 minutes	zone
Anatoxine diphtérique (à 500 unités par cm³) : 1 cm³	Sérum de Cheval antidiphtérique (à 500 unités par cm³) dilué au 1/10 : 0,80 cm³	0,20 cm³ pour 2 cm³ dilué au 1/2	293 minutes	350 minutes	zone
Toxine tétanique (à 28 unités par cm³) : 1 cm³	Sérum de Cheval antitétanique (à 310 unités par cm³) dilué au 1/2 : 0,18 cm³	0,20 cm³ pour 1 cm³	68 minutes	285 minutes	zone
Toxine pesteuse : 0,50 cm³	Sérum de Cheval antipesteux : 0,50 cm³	0,10 cm³ pour 2 cm³ dilué au 1/2	floculation comprise entre 7 h. et 12 h.	plus de floculation après 24 h.	zone
Anatoxine botulique : 1 cm³	Sérum de Cheval antibotulique : 2 cm³	0,15 cm³ pour 1 cm³	floculation nette 24 h. après	floculat beaucoup moins abondant	

1° Dans tous les cas, la ninhydrine, ayant préalablement agi sur l'anticorps, retarde la vitesse de floculation du système.

2° Dans tous les cas où il était possible d'observer une zone de primofloculation, nous n'avons jamais observé de modification du titre en anticorps; c'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous ne rapportons dans le tableau précédent que les chiffres correspondants à la primofloculation.

XII. — COMPOSITION DU PRÉCIPITÉ SPÉCIFIQUE APRÈS TRAITEMENT DE L'IMMUNSÉRUM PAR LA NINHYDRINE.

Les modifications apportées par ce réactif au phénomène de floculation nous conduisent à envisager la composition du précipité spécifique formé à partir d'un sérum ninhydrinisé.

Dans une première expérience portant sur le système toxine diphtérique - sérum antidiphtérique de Cheval, nous avons comparé l'abondance du précipité spécifique formé à partir d'un sérum « ninhydrinisé » et du même immunsérum non traité, en nous plaçant dans la zone des proportions optima. Nous avons étudié le phénomène en fonction du temps de séjour au bain-marie à 37° C. La dose de ninhydrine utilisée dans cette expérience est de 0,30 cm³ de solution à 1 p. 100 par cm³ de sérum; le réactif agit une demi-heure à 37° C.

Dans le tableau XIII se trouvent les chiffres correspondants chacun à 100 cm³ de sérum.

TABLEAU XIII

Temps écoulé après le début de la floculation	Poids des précipités spécifiques	
	Sérum témoin	Sérum ninhydrinisé
0 minute	0 85	0,80
15 minutes	0,98	0,82
30 minutes	0,96	0,91
1 heure	0,99	0,86
3 heures	0,96	0,86
6 heures	1,03	0,93
14 heures	1,01	0,98

Ces chiffres permettent de conclure que le précipité obtenu avec le sérum « ninhydrinisé » est légèrement moins abondant que celui formé à partir du sérum témoin.

Comment peut-on interpréter cette constatation ?

On peut penser tout d'abord que cela est dû à l'action de la ninhydrine qui, nous l'avons vu (voir p. 43), désamine partiellement les protéines; on obtient donc, dans le cas de l'immunsérum « ninhydrinisé », des protéines « appauvries en azote », donc en poids. EGGERTH [67] a d'ailleurs eu l'occasion d'insister, chiffres à l'appui, sur cette diminution de la teneur en azote des protéines ninhydrinisées (*).

Afin de voir si notre conception était bien fondée, nous avons effectué une nouvelle expérience dans laquelle nous avons déterminé la teneur en azote des précipités spécifiques (**). Le tableau XIV indique le pourcentage en azote des précipités spécifiques obtenus dans quatre expériences différentes.

TABLEAU XIV

Expérience N°	P. 100 d'azote du précipité	
	Série témoin	Série ninhydrine
1	16,7	15,8
2	16,3	15,9
3	16,4	15,3
4	16,2	16,0

L'expérience montre bien que le précipité spécifique formé à partir d'un sérum ninhydrinisé est moins abondant que celui provenant du même sérum non traité. La différence de poids doit être rattachée à l'effet désaminant exercé par la ninhydrine sur les anticorps.

(*) Les chiffres d'EGGERTH ne sauraient cependant pas être pris en considération dans notre étude, car les doses de ninhydrine utilisées par cet auteur sont très nettement supérieures à celles que nous avons employées.

(**) Cette détermination a été effectuée par la méthode de KJEHLDAHL [voir 150].

CONCLUSIONS DU SECOND CHAPITRE

Dans ce chapitre, nous avons étudié l'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums précipitants, et nous avons montré qu'après action de ce réactif (solution 1 p. 100, une demi-heure à 37° C), l'immunsérum floculе beaucoup plus lentement lorsqu'on le met en présence de son antigène.

En étudiant un certain nombre d'antigènes (toxine et anatoxine diphtérique, toxine tétanique, toxine pesteuse et anatoxine botulique), nous avons mis en évidence la généralité du phénomène.

Nous avons encore montré que cette constatation devait être rattachée à l'action de la ninhydrine sur l'anticorps, car le pigment bleu formé et les aminoacides libres du sérum n'interviennent nullement dans le phénomène.

Après action de la ninhydrine, l'immunsérum a conservé son titre en anticorps et sa spécificité. Les précipités antigène-anticorps obtenus avec un immunsérum traité par la ninhydrine sont moins abondants que ceux obtenus avec un sérum témoin : ceci est dû à la désamination produite par la ninhydrine.

Il est curieux de noter la différence d'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums de Lapin et sur les immunsérums de Cheval. Dans le premier cas, elle augmente la vitesse de floculation; dans le second cas, au contraire, elle la retarde. Il y a là un fait imprévu, car tous les réactifs utilisés jusqu'ici (formol, cétène, isocyanate, iode, monobromacétate, etc.) se conduisent d'une façon identique vis-à-vis des immunsérums de Lapin et des immunsérums de Cheval.

Il est une constatation qui vient à l'esprit, c'est que les anticorps du Lapin se trouvent surtout dans la fraction euglobuline, tandis que les anticorps du Cheval sont surtout pseudoglobuliniques; on peut donc penser que la ninhydrine exerce une action différente sur ces deux fractions, ce qui expliquerait ainsi le comportement différent des immunsérums de Lapin et de Cheval.

Une étude détaillée de la différence d'action exercée par la ninhydrine sur les euglobulines et les pseudoglobulines nous renseignera sur l'éventuel bien-fondé de cette conception (chapitre IV), mais auparavant il est utile d'étudier les différents paramètres du phénomène que nous venons de décrire chez le Lapin et chez le Cheval (chapitre III).

CHAPITRE III

ÉTUDE DE QUELQUES PARAMÈTRES INFLUENÇANT L'ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN ET DE CHEVAL

Dans les deux premiers chapitres de nos recherches expérimentales, nous avons noté que, si l'on fait agir la ninhydrine (1 p. 100 à 37° C pendant une demi-heure), sur un immunsérum précipitant de Lapin, la floculation se trouve fortement accélérée en présence de l'antigène correspondant; avec un immunsérum de Cheval, on observe le phénomène inverse.

Avant de tenter une interprétation de cette constatation, nous ne pensons pas inopportun d'étudier en détail les divers facteurs susceptibles d'influencer le phénomène que nous étudions.

I. — IMMUNSÉRUM DE LAPIN

A. — Influence de la concentration en ninhydrine

Pour réaliser cette étude, nous avons mis en jeu une solution de ninhydrine à 1 p. 100 dans l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7; toutes nos dilutions ont été effectuées avec de l'eau physiologique également tamponnée à *p*H 7. La ninhydrine agit sur le sérum préalablement dilué au demi pendant une demi-heure et à la température de 37° C. Pour chaque concentration en ninhydrine étudiée, nous avons effectué trois essais, l'un d'eux correspond à la zone des proportions optima, les deux autres correspondent aux zones immédiatement voisines de part et d'autre.

Nos expériences ont été réalisées sur un sérum de Lapin

antipseudoglobulines de Cheval et nos titrations effectuées selon la technique de DEAN et WEBB [49].

Le tableau XV indique les différentes concentrations que nous avons étudiées et les résultats obtenus.

Au tableau correspondent les courbes de la figure 6.

TABLEAU XV

Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par cm^3 de sérum traité	Aspect du mélange après traitement	Temps de floculation (minutes)		
		Dilution de l'antigène		
		1/32	1/64 Zone des proportions optima	1/256
0 (témoin)	incolore	62	32	51
0,2	—	62	32	51
0,4	—	60	30	50
0,8	—	39	26	32
1,2	bleuté	35	22	29
1,6	—	32	18	24
2,0	bleu pâle	26	16	23
2,4	—	19	14	17
2,8	—	15	10	13
3,2	—	10	7	9
3,6	—	7	6	7
4,0	bleu +	6	5	6
4,4	bleu ++	5	4	5
4,8	bleu trouble	4	4	4
6,0	—	4	4	4
7,2	—	précipité	précipité	précipité
8,4	—	—	—	—
9,6	—	—	—	—
10	—	—	—	—

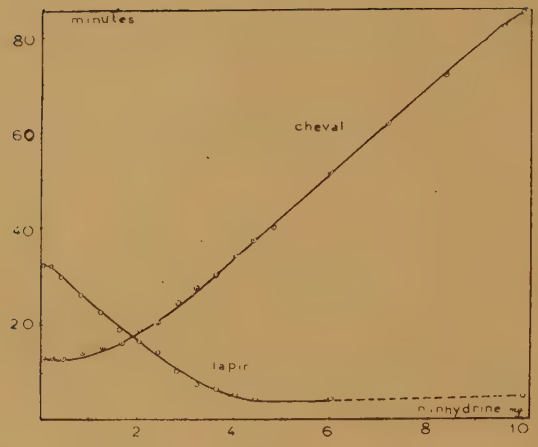


FIG. 6.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation (minutes) dans la zone des proportions optima, en fonction du poids de ninhydrine (mg) mis en jeu par cm³ de sérum. (Cas du Cheval et du Lapin.)

Il ressort de nos résultats que l'accélération de la floculation se montre proportionnelle à la quantité de ninhydrine mise en jeu. Notons cependant que, dès la concentration de 4,8 mg par cm³ en ninhydrine, il apparaît une précipitation non spécifique. Remarquons encore que, plus la concentration en ninhydrine est élevée, plus la différence entre les temps de floculation des trois échantillons est faible. Ceci se conçoit fort bien : en activant la floculation, la ninhydrine réduit proportionnellement les différences entre les divers tubes de la gamme de titration; la zone des proportions optima s'élargit; elle finit même, pour certaines concentrations élevées en ninhydrine, par s'élargir tellement que, pratiquement, tous les tubes de la gamme floculent en même temps.

B. — Influence du temps de contact entre l'immunsérum et la ninhydrine

Dans toutes les expériences que nous avons décrites jusqu'ici, nous avons fait agir la ninhydrine sur les sérums pendant une demi-heure; des essais préliminaires nous avaient montré que ce temps de contact ne semblait pas amener de perturbations apparentes dans les sérums traités. Nous avons donc étudié le facteur temps de contact. Ici encore, nous avons

mis en jeu des sérums de Lapin antipseudoglobulines de Cheval que nous avons titrés de la même façon que précédemment (Dean et Webb [49]).

Afin d'éviter la précipitation des protéines dans les échantillons soumis longtemps à l'action de ce réactif, nous avons utilisé dans ces essais une dose de ninhydrine de 0,10 cm³ de solution à 1 p. 100 par cm³ de sérum traité. Nous rapportons dans ce chapitre deux de nos expériences qui ont toutes donné des résultats comparables : dans la première, la ninhydrine (en solution à 1 p. 100) agit sur les sérums dilués au demi; dans la seconde, elle agit sur le sérum dilué au 1/8.

La comparaison entre les résultats obtenus nous permettra de savoir si le facteur dilution vaut la peine d'être étudié.

Le tableau XVI correspondant à ces expériences indique les temps pendant lesquels la ninhydrine a réagi sur les immunsérums et les temps de floculation observés. Parallèlement, nous avons fait une expérience témoin, dans laquelle la solution de ninhydrine a été tout simplement remplacée par de l'eau physiologique.

TABLEAU XVI

Temps de contact entre la ninhydrine et le sérum	1re expérience		2e expérience	
	Temps de floculation (minutes)		Temps de floculation (minutes)	
	Témoin sans ninhydrine	Sérum ninhydrinisé	Témoin sans ninhydrine	Sérum ninhydrinisé
2 minutes	40	22	33	29
5 minutes	37	20	33	26
10 minutes	39	21	35	23
15 minutes	39	22	34	21
30 minutes	36	15	35	22
1 heure	33	19	33	20
2 heures	36	20	32	19
4 heures	34	21	33	18
6 heures	33	22	32	19
8 heures	35	22	33	19
24 heures	36	précipité	.....	.....

Pour les titrations, nous nous sommes placée à la zone des proportions optima, après avoir vérifié, par des essais préliminaires, que le titre en anticorps n'était pas modifié par le traitement à la ninhydrine.

Au tableau XVI correspondent les courbes des figures 7 et 7 bis.

Ces résultats obtenus dans la première de nos expériences montrent combien l'action de la ninhydrine est rapide : après deux minutes de contact, l'accélération apportée à la floculation est identique à celle provoquée par un contact de quatre heures. Il n'en est plus de même lorsque la ninhydrine agit sur un sérum dilué au 1/8. Dans ce cas, l'action de la ninhydrine met plus de temps à se manifester.

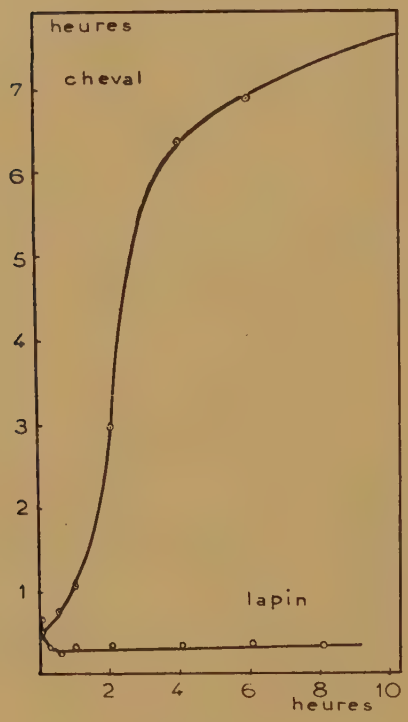


FIG. 7.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation (heures) dans la zone des proportions optima, en fonction du temps de contact (heures) entre la ninhydrine et l'immunsérum. (Cas du Cheval et du Lapin.)

Quoi qu'il en soit, deux faits paraissent dignes d'être retenus : la rapidité d'action de la ninhydrine sur les protéines du sérum de Lapin et l'influence de la dilution du milieu.

C. — Influence de la dilution du milieu

Les expériences concernant le rôle exercé par la dilution du sérum sur l'action de la ninhydrine ont porté sur le système pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin.

La concentration en ninhydrine mise en jeu est de 0,10 cm³ de solution à 1 p. 100 par cm³ de sérum; la ninhydrine réagit pendant une demi-heure à 37° C. Ces dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7,

Nos expériences sont menées de la façon suivante : on prépare neuf tubes contenant chacun un même volume d'immunsérum de Lapin (0,25 cm³) ; on ajoute ensuite des quantités croissantes d'eau physiologique tamponnée, puis partout un même volume de solution de ninhydrine. On porte chaque mélange une demi-heure à 37° C. On complète ensuite les divers échantillons à un même volume avec de l'eau physiologique tamponnée et l'on effectue les titrations. Un témoin est traité de la même façon, mais l'eau physiologique a remplacé la solution de ninhydrine.

Nos résultats se trouvent réunis dans le tableau XVII, auquel correspond la courbe de la fig. 8.

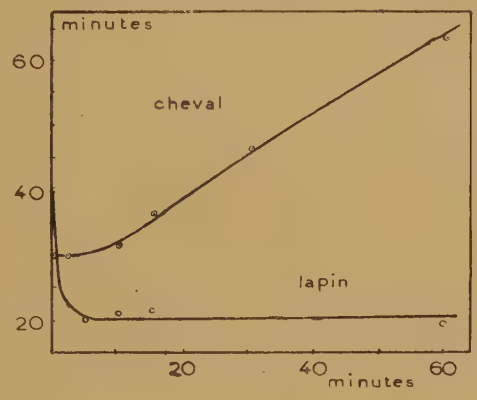


Fig. 7 bis

Courbes représentatives des variations du temps de floculation (minutes), dans la zone des proportions optima, en fonction du temps de contact (minutes) entre la ninhydrine et l'immunsérum. (Cas du Cheval et du Lapin.)

Il ressort de cette étude que la dilution du sérum représente un facteur très important : plus le sérum est dilué, plus l'action exercée par la ninhydrine est faible. Pour un sérum extrêmement dilué, la ninhydrine finit même par se montrer sans action.

D. — Influence du *p*H d'action de la ninhydrine

Dans ces expériences, nous avons fait agir la ninhydrine dans les mêmes conditions de concentration, de temps d'action, de température et de dilution pour différents *p*H ; nous avons ensuite ramené les *p*H de chaque solution à 7 avant d'effectuer nos titrations. C'est là une précaution indispensable, car on sait [238] que le *p*H auquel s'effectue la réaction de précipitation influence la vitesse de floculation. C'est ainsi, par exemple, que la vitesse de floculation du système toxine diphtérique - serum antidiphtérique se trouve sensiblement augmentée au-dessous de *p*H 6 et au-dessus de *p*H 8.

TABLEAU XVII

Expérience I (tubes)	Quantité d'eau physiologique ajoutée à à 0,25 cm³ de sérum avant l'action de la ninhydrine (cm³)	Quantité d'eau physiologique ajoutée après action de la ninhydrine (cm³)	Temps de floculation (minutes)
1	0	3,65	28
2	0,25	3,40	31
3	0,75	2,90	35
4	1,25	2,40	40
5	1,75	1,90	43
6	2,25	1,40	45
7	2,75	0,90	48
8	3,25	0,40	50
9	Le témoin (sans ninhydrine) flocule en 83 minutes		

Expérience II (tubes)	Quantité d'eau physiologique ajoutée à 0,25 cm³ de sérum avant l'action de la ninhydrine (cm³)	Quantité d'eau physiologique ajoutée après action de la ninhydrine (cm³)	Temps de floculation (minutes)
1	0	7,65	68
2	0,75	6,90	79
3	1,75	5,90	86
4	2,75	4,90	89
5	3,75	3,90	95
6	4,75	2,90	99
7	5,75	1,90	105
8	6,75	0,90	115
9	Le témoin (sans ninhydrine) flocule en 130 minutes		

N. B. — Pour l'expérience I, la ninhydrine agit sur le sérum de plus en plus dilué. La dilution, après action de ce réactif, est complétée au 1/16. Pour l'expérience II elle est complétée au 1/32.

Pour réaliser cette expérience, nous avons préparé une série de tubes dans lesquels nous avons placé la même quantité de sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval, nous avons ensuite ajouté soit de l'acide chlorhydrique N/10, soit de la soude N/10, de façon à obtenir des *p*H échelonnés entre 5,5 et 10. Nous avons ajusté ensuite les dilutions dans chaque

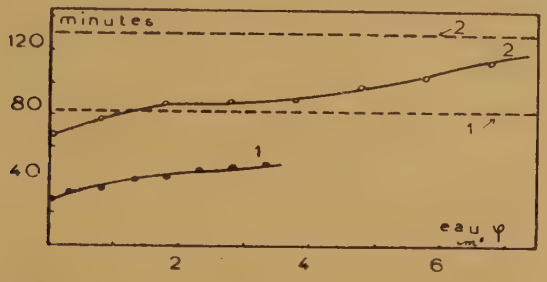


FIG. 8.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation (minutes) en fonction de la quantité d'eau physiologique (cm³) ajoutée au sérum de Lapin avant l'action de la ninhydrine (le temps de floculation du sérum témoin est représenté par des pointillés).
La courbe 1 correspond à la dilution au 1/16; la courbe 2 correspond à la dilution au 1/32.

tube avec de l'eau physiologique, de façon à ce que l'addition ultérieure d'une même dose de ninhydrine dans chaque mélange complète la dilution au demi. Nous avons ajouté alors une même quantité de solution de ninhydrine (0,10 cm³ par cm³ de sérum) qui agit sur le sérum dilué au demi pendant une demi-heure à 37° C. Après action de la ninhydrine, le *p*H initial est modifié. Nous ajoutons, enfin, soit de l'acide chlorhydrique N/10, soit de la soude N/10 afin de ramener le *p*H à 7 (*).

Au cours des opérations précédentes, nous avons ajouté de l'acide chlorhydrique puis de la soude ou l'inverse; il s'est donc formé du chlorure de sodium. Nous avons calculé la quantité de chlorure de sodium formée et nous avons ajusté le titre en chlorure de sodium de chaque mélange, afin qu'il soit partout identique.

Il ne nous reste plus maintenant qu'à compléter la dilu-

(*) Mesures de *p*H effectuées à l'aide du *p*H-mètre Radiometer (Copenhague).

tion de chaque mélange afin de nous trouver à des dilutions convenables pour effectuer la titration (sérum dilué au 1/8, pseudoglobulines diluées au 1/128). Ces dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7; cela présente l'avantage d'inhiber les modifications éventuelles de *p*H dues à l'action de la ninhydrine qui continue à se manifester quand on effectue les titrations à la température du bain-marie.

Ayant vérifié qu'il ne se produisait pas de modifications du titre en anticorps, nous rapportons seulement dans le tableau XVIII les vitesses de floculation correspondant à la zone des proportions optima.

TABLEAU XVIII

*p*H d'action de la ninhydrine	Temps de floculation : zone des proportions optima (minutes)	Pourcentage d'augmentation par rapport au temps de floculation du témoin (sans ninhydrine)
5,4	15	50
5,8	13	56
6,2	10	66
7,2	10	66
7,6	15	50
8,5	17	43
8,8	25	16
9,1	28	6
9,8	30	0
7,6 (Témoin)	30	0

Au tableau XVIII correspond la courbe de la figure 9.

Il ressort de ces essais que la ninhydrine est active sur les immunsérums de Lapin dans une gamme assez large de *p*H comprise entre 6,2 et 7,2. En dehors de cette zone, l'action de la ninhydrine se montre nettement diminuée, ainsi que l'exprime la courbe de la figure 9.

II. — IMMUNSÉRUM DE CHEVAL

A. — Influence de la concentration en ninhydrine

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé un sérum de Cheval antidiphtérique et nos titrations ont été effectuées selon la technique de Ramon [216].

Nous avons réalisé la « ninhydrisation » de l'immunsérum de Cheval de la même façon que celle de l'immunsérum de Lapin (voir chapitre premier). Ainsi, il nous sera possible de comparer les résultats obtenus pour ces deux types d'immunsérums.

Ayant vérifié que la ninhydrine, quelle que soit sa concentration, ne modifie pas le titre en anticorps du sérum de Cheval antidiphtérique, nous ne rapportons que les temps de floculation correspondant à la zone des proportions optima. Le tableau XIX indique les différentes concentrations que nous avons étudiées ainsi que les résultats obtenus. Au tableau correspondent les courbes de la figure 6.

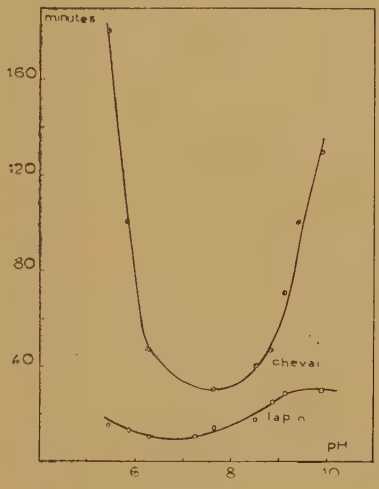


Fig. 9.

Courbes représentatives des variations du temps de floculation (minutes), dans la zone des proportions optima, en fonction du *p*H auquel la ninhydrine a réagi sur l'immunsérum. (Cas du Cheval et du Lapin.)

Les résultats montrent que le retard apporté à la floculation est d'autant plus grand que la dose de ninhydrine mise en jeu est élevée. Lorsque cette dose atteint un taux très élevé, la précipitation ne se produit même plus.

Dans une seconde expérience, nous avons utilisé des quantités de ninhydrine plus élevées encore (*).

(*) Cette seconde expérience n'est pas exactement comparable à l'expérience mettant en jeu l'immunsérum de Lapin (page 78), car nous ajoutons des volumes de solution de ninhydrine (à 1 p. 100) de plus en plus grands; la dilution à laquelle agit la ninhydrine est donc plus élevée.

TABLEAU XIX

Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par cm^3 de sérum traité	Aspect du mélange après traitement	Temps de floculation (minutes) dans la zone des proportions optima (sérum dilué 1/8 ; toxine à 45 unités)
0 (témoin)	incolore	13
0,2	—	13
0,4	—	13
0,8	—	14
1,2	—	15
1,6	bleu pâle	16
2,0	—	18
2,4	—	19
2,8	—	22
3,2	—	27
3,6	—	30
4,0	bleu	34
4,4	—	37
4,8	—	40
6,0	—	51
7,2	—	61
8,4	—	71
9,6	—	81
10	—	84

Le tableau XX indique les différentes concentrations et les résultats obtenus.

TABLEAU XX

Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par cm^3 de sérum traité	Aspect des mélanges après traitement	Temps de floculation (minutes) dans la zone des proportions optima (sérum dilué 1/8 ; toxine à 45 unités)
0 (témoin)	incolore	12
0,4	—	12
0,8	—	12
1,6	bleu pâle	14
3,2	—	17
4,8	bleu	25
10	bleu +	32
20	bleu ++	52
30	bleu +++	75
40	bleu +++ et précipité	82

Cette expérience montre encore que le retard augmente constamment en fonction de la concentration en ninhydrine. Pour des concentrations élevées en ninhydrine (30 mg par cm^3), le retard peut atteindre 58 p. 100; lorsque la concentration en ninhydrine atteint une certaine valeur, il se produit, de même que pour le sérum de Lapin, une précipitation non spécifique, mais nous constatons ici qu'il faut beaucoup plus de ninhydrine pour la produire qu'avec le sérum de Lapin.

B. — Influence du temps de contact entre l'immunsérum et la ninhydrine

Dans toutes les expériences que nous avons décrites jusqu'ici, nous avons fait agir la ninhydrine sur les sérums pendant une demi-heure. Des essais préliminaires nous ayant

montré que ce temps de contact amenait des modifications des temps de floculation, nous avons étudié ce facteur.

Mettant en jeu le sérum de Cheval antidiphtérique, nous l'avons titré de la même façon que précédemment (Ramon). Afin d'éviter la précipitation des protéines dans les échantillons soumis longtemps à l'action de ce réactif, nous avons utilisé pour ces essais une dose de ninhydrine de 0,30 cm³ de solution à 1 p. 100 par cm³ de sérum traité (*).

Nous rapportons dans ce chapitre deux de nos expériences; dans la première, la ninhydrine (en solution à 1 p. 100) agit sur le sérum dilué au demi; dans la seconde, elle agit sur le sérum dilué au 1/8. La comparaison entre les résultats obte-

TABLEAU XXI

Temps de contact entre la ninhydrine et le sérum	1re expérience Temps de floculation (minutes) Sérum « ninhydrinisé »	2e expérience Temps de floculation (minutes) Sérum « ninhydrinisé »
2 minutes	28	28
10 minutes	31	31
15 minutes	36	36
30 minutes	46	46
1 heure	63	50
2 heures	176	61
4 heures	380	68
6 heures	# 410	80
8 heures	> 7 heures	150
Temps voisin de 24 heures	Précipité non spécifique	Précipité non spécifique
Témoin = temps 0	25	25

N.B. - Temps de floculation du témoin sans ninhydrine: 28 minutes.

(*) Pour l'étude correspondante du sérum de Lapin, nous avions utilisé 0,10 cm³ de solution à 1 p. 100 pour 1 cm³ de sérum, car ce sérum se montre beaucoup plus sensible que le sérum de Cheval à l'action de la ninhydrine qui tend à provoquer une précipitation non spécifique.

nus nous permettra de juger si, dans le cas du Cheval, le facteur dilution mérite également d'être étudié. Le tableau XXI indique les temps pendant lesquels la ninhydrine a réagi sur les immunsérums et les temps de floculation observés. A ce tableau correspondent les courbes des figures 7 et 7 bis (voir pages 82 et 83). Parallèlement, nous avons effectué une expérience témoin dans laquelle la solution de ninhydrine a été remplacée par de l'eau physiologique. Pour les titrations, nous nous sommes placée dans la zone des proportions optima après avoir vérifié que le titre en anticorps n'était pas modifié par l'action de la ninhydrine.

Les résultats obtenus montrent que le retard apporté par une même dose de ninhydrine dépend du temps pendant lequel elle agit. Nous constatons aussi que les retards se montrent plus élevés dans la première série d'expériences. Ces expériences mettent en évidence l'action progressive de la ninhydrine sur les protéines du sérum de Cheval et le rôle joué par la dilution du milieu.

C. — Influence de la dilution du milieu

Nos expériences sur le rôle exercé par la dilution du sérum sur l'action de la ninhydrine ont porté sur le système toxine diphtérique - antisérum de Cheval.

La concentration de ninhydrine utilisée est de 0,30 cm³ de solution à 1 p. 100 par cm³ de sérum; la ninhydrine réagit pendant une demi-heure à 37° C. Ces dilutions sont effectuées avec de l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7. Nos expériences sont menées de la même façon que pour l'étude de la dilution du milieu sur le sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval (page 82).

Nos résultats sont consignés dans le tableau XXII auquel correspond la courbe de la figure 10.

Il ressort de cette étude que le facteur dilution représente un élément important : plus le sérum est dilué, plus l'action exercée par la ninhydrine est faible.

Pour un sérum suffisamment dilué (dilution proche de 1/32), la ninhydrine se montre en effet presque sans action.

D. — Influence du *p*H d'action de la ninhydrine

Pour effectuer cette étude, nous avons utilisé du sérum de Cheval antidiphtérique traité par la ninhydrine (0,30 cm³ de ninhydrine en solution à 1 p. 100 par cm³ de sérum). Nous

TABLEAU XXII

Volume d'eau physiologique ajouté à 0,50 cm³ de sérum avant l'action de la ninhydrine (cm³)	Volume d'eau physiologique ajouté après action de la ninhydrine (cm³)	Temps de floculation (minutes)
0	15,35	215
0,50	14,85	190
1,50	13,85	90
3,50	11,85	75
5,50	9,85	59
7,50	7,85	50
9,50	5,85	42
11,50	3,85	38
13,50	1,85	35

N. B. - Le témoin sans action de la ninhydrine flocule en 30 minutes.

N. B. — La ninhydrine agit sur le sérum de plus en plus dilué; la dilution, après action de la ninhydrine, est complétée au 1/32.

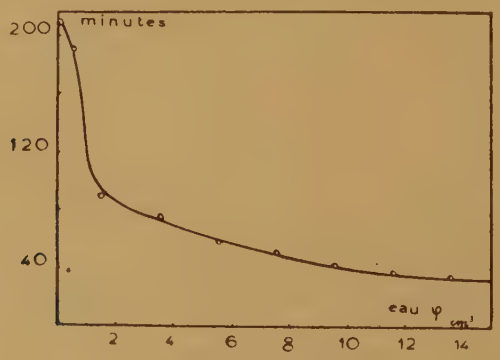


FIG. 10.

Courbe représentative des variations du temps de floculation (minutes), en fonction de la quantité d'eau physiologique (cm³) ajoutée au sérum de Cheval avant l'action de la ninhydrine.

avons mené cette étude de la même façon que celle décrite pour le sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval (voir page 83). Le tableau XXIII rapporte nos résultats.

TABLEAU XXIII

*p*H d'action de la ninhydrine	Temps de floculation Zone des proportions optima (minutes)	Pourcentage de retard par rapport au temps de floculation du témoin sans ninhydrine
5,4	180	950
5,8	100	488
6,2	47	176
7,2	40	135
7,6	30	43
8,5	40	135
8,8	47	176
9,1	70	311
9,4	100	480
9,8	130	660
7,5 (Témoin)	17	

Au tableau correspond la courbe de la figure 9 (voir p. 87). Il ressort de ces essais que la ninhydrine se montre moins active entre *p*H 6,2 et 8,8. De part et d'autre de cette zone, le retard provoqué par la ninhydrine est nettement augmenté : de *p*H 5,4 à 6,2; de *p*H 8,8 à 9,8.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons étudié dans ce chapitre les divers facteurs susceptibles d'exercer une influence sur le phénomène que nous étudions.

Nos essais permettent les conclusions suivantes :

a) La ninhydrine accélère d'autant plus la vitesse de floculation d'un immunsérum de Lapin qu'elle agit à doses élevées;

en revanche, plus elle agit à dose élevée sur le sérum de Cheval, plus elle retarde la floculation.

b) L'action de la ninhydrine se montre très rapide, pratiquement instantanée, même lorsqu'elle agit sur du sérum de Lapin peu dilué; cette action demande au contraire un certain temps avec le sérum de Cheval peu dilué.

c) Plus le sérum est dilué, plus l'action exercée par la ninhydrine est faible. Cette constatation s'applique au sérum de Cheval comme au sérum de Lapin.

d) Il existe une zone de *p*H optimum pour laquelle la ninhydrine agit plus nettement sur la floculation d'un immunsérum. L'optimum d'action est différent suivant qu'il s'agit du Cheval ou du Lapin.

L'étude de ces divers paramètres présente un intérêt pour l'interprétation des phénomènes observés. Nous aurons d'ailleurs l'occasion de le constater ultérieurement.

CHAPITRE IV

INTERPRÉTATION DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS : ROLE ÉVENTUEL DE LA SOLUBILITÉ DES ANTICORPS MIS EN JEU

Nous avons constaté précédemment qu'un anticorps précipitant de Lapin, traité par la ninhydrine dans des conditions que nous avons décrites, flocule beaucoup plus rapidement que le témoin non traité, lorsqu'on le met en présence de son antigène. Nous avons observé un phénomène inverse avec le sérum de Cheval : l'action de la ninhydrine a pour effet dans ce cas d'augmenter le temps de floculation.

Pour expliquer cette différence de comportement des immunsérums de Lapin et de Cheval vis-à-vis de la ninhydrine, nous avons fait appel à la localisation différente des anticorps chez ces deux animaux : on sait, en effet, que chez le Lapin les anticorps se trouvent surtout dans la fraction *euglobulines* (*), tandis que chez le Cheval ils suivent la fraction *pseudoglobulines* (**). Nous pensons donc que la ninhydrine doit agir différemment sur ces deux fractions protéi-

(*) Ces termes *euglobulines* et *pseudoglobulines* ne doivent pas être utilisés sans que soit mentionnée la technique ayant permis leur obtention (Machebœuf, Tayeau et Battut [166], Tayeau et Martin [264]). Selon Marcus [167], les euglobulines sont représentées par la fraction des globulines insolubles dans l'eau pure; on peut obtenir ainsi les euglobulines en portant à la dialyse contre de l'eau distillée continuellement renouvelée le précipité de globulines totales obtenues, selon Hofmeister [113], par demi-saturation du sérum en sulfate d'ammonium (voir Quinan [214]). Ces pseudoglobulines représentent alors la fraction soluble dans l'eau pure. Selon Porges, Fuld et Spiro [212, 78], les euglobulines peuvent être obtenues par saturation au tiers du sérum à l'aide de sulfate d'ammonium; les pseudoglobulines constituent la fraction qui précipite entre le tiers et la demi-saturation en ce sel. Les euglobulines de Marcus et celles de Fuld et Spiro ne sont pas

diques, ce qui expliquerait le comportement différent des sérums de Lapin et de Cheval.

Nous avons étudié dans une première partie la solubilité des protéines sériques (***) traitées ou non par la ninhydrine, puis désirant mieux saisir les modifications apportées par la ninhydrine à la solubilité des protéines du sérum de Lapin et de Cheval, nous avons traité les sérums par la ninhydrine dans des conditions variées; nous avons ensuite comparé les fractions obtenues à l'aide du sulfate d'ammonium au tiers et à demi-saturation. Nous avons cherché enfin à mettre en évidence la sensibilité différente des sérums de Lapin et de Cheval vis-à-vis des doses élevées de ninhydrine.

La transposition des résultats obtenus dans le domaine immunologique (deuxième partie) nous permettra de savoir si l'hypothèse que nous venons d'émettre est bien fondée ou non.

I. — ÉTUDE DE LA SOLUBILITÉ DES PROTÉINES SÉRIQUES « NINHYDRINISÉES »

A. — Solubilité des protéines sériques traitées ou non par la ninhydrine dans les solutions de sulfate d'ammonium.

Pour étudier la solubilité des protéines, nous avons mis en jeu l'un des sels les plus utilisés habituellement : le sulfate

---

identiques (Tayeau et Martin [264]), surtout au point de vue immunologique ; lorsque l'on sépare les euglobulines des pseudoglobulines d'un sérum antidiphtérique de Cheval, on constate que, dans la plupart des cas, tous les anticorps se trouvent localisés dans les pseudoglobulines; si l'on utilise la méthode de Porges, Fuld et Spiro, on retrouve la majeure partie des anticorps dans les pseudoglobulines, mais on en trouve aussi dans les euglobulines (voir Neuzil [183]).

Signalons à ce sujet l'un des essais que nous avons effectué tout au début de nos recherches : nous disposions alors d'un sérum antidiphtérique de Cheval titrant 500 unités par cm^3; les euglobulines obtenues selon Marcus en contenaient 10 et les pseudoglublines 490; les euglobulines selon Porges, Fuld et Spiro contenaient 110 unités et les pseudoglobulines le reste (environ 380). Nous disposions, d'autre part, d'un sérum de Lapin également antidiphtérique titrant 12 unités par cm^3; les euglobulines obtenues selon Marcus contenaient 8 unités, celles préparées selon Porges, Fuld et Spiro en contenaient 7.

Dans la majeure partie de nos essais, c'est la technique de Porges, Fuld et Spiro que nous avons utilisée.

(**) Tout au moins avec les antigènes mis en jeu dans nos essais (voir plus loin, pages 114 et 116).

(***) Nos études ont porté uniquement sur les fractions globuliniques, la fraction « albumines » ne contenant jamais d'anticorps.

d'ammonium. Nous avons choisi ce sel en raison de sa grande solubilité dans l'eau et de son grand pouvoir précipitant vis-à-vis des protéines sériques. Nos expériences ont porté sur le sérum de Lapin et sur le sérum de Cheval.

1° *Sérum de Lapin*

La difficulté que l'on éprouve à se procurer un important volume de sérum provenant d'un même lapin explique le nombre relativement restreint de points que comportent nos courbes concernant cet animal. Un certain volume de sérum de lapin est divisé en deux parts égales : l'une de ces parts est traitée par la ninhydrine (0,15 cm^3 de solution de ninhydrine à 1 p. 100 par cm^3 de sérum dilué au demi, action maintenue une demi-heure à 37° C) ; l'autre part est traitée de la même façon, mais la solution de ninhydrine est remplacée par de l'eau physiologique. Chaque part est alors divisée en échantillons, dont chacun reçoit une quantité différente de solution saturée de sulfate d'ammonium neutralisée; tous les échantillons sont complétés à un même volume. Les précipités formés recueillis par centrifugation servent au dosage des protéines (*).

Le tableau XXIV indique les mélanges que nous avons effectués et les résultats obtenus.

Ces résultats montrent :

1° Que la ninhydrine apporte des modifications dans la solubilité des protéines sériques; nous constatons, en effet, qu'à concentration égale en sulfate d'ammonium, la quantité de protéines précipitées se montre beaucoup plus abondante avec le sérum « ninhydrinisé » qu'avec le sérum témoin;

2° Que la différence est d'autant plus marquée que la fraction protéidique considérée est moins soluble : si l'on établit, en effet, pour chaque concentration en sulfate d'ammonium étudiée, le rapport

$$\frac{\text{protéines précipitées du sérum ninhydrinisé}}{\text{protéines précipitées du sérum témoin}}$$

(*) Le dosage des protéines est effectué selon la technique décrite par Machebœuf (voir Tayeau [252]) : épuisement du précipité trois fois par l'alcool bouillant, une fois par l'éther, de nouveau par l'alcool et, enfin, par l'eau bouillante; pesée du résidu après dessiccation vingt-quatre heures à 100° C.

on obtient les chiffres suivants :

Taux de saturation en sulfate d'ammonium	Rapport
0,18	∞
0,20	∞
0,30	11
0,35	2,1
0,50	1,7
0,55	1,6

Cette constatation montre donc que les fractions les moins solubles (euglobulines) sont nettement plus sensibles à l'action de la ninhydrine que les fractions les plus solubles (pseudo-globulines).

TABLEAU XXIV

Taux de saturation en sulfate d'ammonium (*)	Poids de protéines précipitées (g.) par 100 cm³ de sérum	
	Témoin sans ninhydrine	Sérum traité par la ninhydrine
0,18	0	louche
0,20	0	0,82
0,30	0,15	1,64
0,35	1,04	2,22
0,50	2,58	4,54
0,55	2,86	4,66

N. B. — Dose de ninhydrine utilisée : 150 mg p. 100 cm³ de sérum.

L'hypothèse que nous avons primitivement échafaudée ne peut avoir de valeur que si nous faisons des constatations identiques avec le sérum de Cheval.

(*) Calcul du degré de saturation en sulfate d'ammonium, afin de connaître la quantité de solution saturée de sulfate d'ammonium à ajouter à un certain volume de sérum pour obtenir un titre déterminé (en prenant la saturation pour unité).

On peut appliquer la formule suivante :

$$X = \frac{TV}{1-T} \text{ ou } \begin{cases} X = \text{Volume (en cm}^3\text{) de la solution saturée en sulfate d'ammonium;} \\ V = \text{Volume du sérum (en cm}^3\text{);} \\ T = \text{Titre à obtenir,} \end{cases}$$

2° *Sérum de Cheval*

La facilité avec laquelle on se procure d'abondantes quantités de sérum de Cheval nous a amenée à réaliser de nombreuses expériences qui ont d'ailleurs concordé entre elles; nous ne rapportons ici que deux de nos essais. Ceux-ci ont été réalisés d'une façon identique à ceux décrits pour le sérum de Lapin. Dans le tableau XXV, nous avons réuni les résultats obtenus; nous avons également mentionné pour les différentes concentrations en sulfate d'ammonium étudiées la valeur des rapports

$$\frac{\text{protéines précipitées du sérum ninhydrinisé}}{\text{protéines précipitées du sérum témoin}}$$

TABLEAU XXV

Taux de saturation en sulfate d'ammonium	Poids de protéines précipitées (g.) par 100 cm³ de sérum					
	1re expérience			2e expérience		
	Témoin sans ninhydrine	Sérum traité par la ninhydrine	Rapport	Témoin sans ninhydrine	Sérum traité par la ninhydrine	Rapport
0	.....	.....	.....	0	0	
0,10	.....	.....	.....	0	louche	∞
0,15	.....	.....	.....	0	0,51	∞
0,18	.....	.....	.....	0	0,95	∞
0,20	.....	.....	.....	0,19	1,38	7,2
0,24	.....	.....	.....	0,59	2,33	3,9
0,28	.....	.....	.....	1,18	3,47	2,9
0,32	1,62	3,56	2,2	2,08	4,32	2,0
0,35	2,74	3,58	1,3	2,96	4,34	1,4
0,38	3,37	4,02	1,2	3,81		
0,40	3,22	4,25	1,3	4,56	5,76	1,2
0,44	3,93			5,37	6,36	1,1
0,48	4,34	4,85	1,1	6,0		
0,50	4,74	5,18	1,0	6,14	6,02	0,9

N. B. — Dose de ninhydrine utilisée : 300 mg pour 100 cm³ de sérum.

Aux tableaux XXIV et XXV correspondent les courbes des figures 11 et 12.

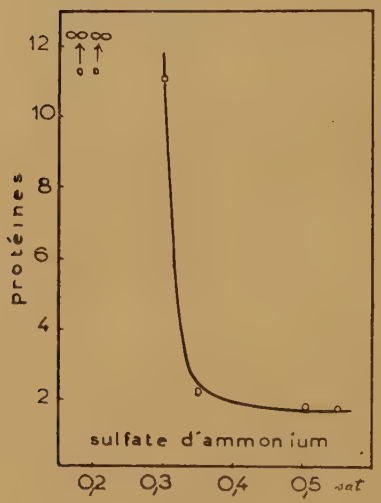


FIG. 11.

Courbe représentative des variations du rapport

$$\frac{\text{Poids de protéines précipitées du sérum ninhydrinisé}}{\text{Poids de protéines précipitées du sérum témoin}}$$

en fonction du taux de saturation en sulfate d'ammonium. (Cas du Lapin.)

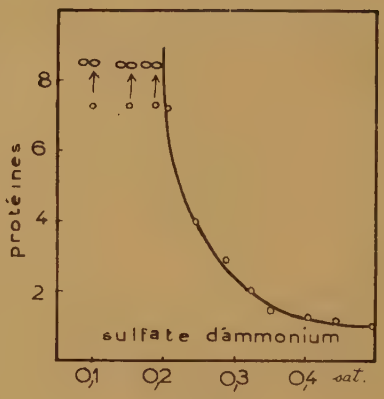


FIG. 12.

Courbe représentative des variations du rapport

$$\frac{\text{Poids de protéines précipitées du sérum ninhydrinisé}}{\text{Poids de protéines précipitées du sérum témoin}}$$

en fonction du taux de saturation en sulfate d'ammonium. (Cas du Cheval.)

Ces résultats, obtenus avec des sérums de Cheval, confirment en tous points les conclusions que nous avons précédemment émises à propos du sérum de Lapin : moins la fraction protéidique est soluble et de ce fait précipite facilement avec le sulfate d'ammonium, plus la ninhydrine se montre active dans l'augmentation de cette insolubilité. Les courbes de la figure 12 et de la figure 13 rendent bien compte de cette constatation en montrant que plus la concentration en sulfate d'ammonium s'élève plus le rapport

$$\frac{\text{protéines précipitées du sérum ninhydrinisé}}{\text{protéines précipitées du sérum témoin}}$$ diminue,

Ces deux séries d'expériences prouvent que les protéines sériques de Lapin et de Cheval subissent des modifications à peu près identiques de leur solubilité sous l'influence de la ninhydrine. Elles montrent, en outre, que, chez le Lapin comme chez le Cheval, la ninhydrine exerce une action beaucoup plus profonde sur la solubilité des euglobulines que sur celles des pseudoglobulines.

B. — Fractions protéidiques des sérums traités par des quantités variées de ninhydrine

Afin de mieux saisir encore les modifications différentes subies par les protéines de Lapin et de Cheval sous l'influence de la ninhydrine, nous avons effectué une étude comparative entre les fractions obtenues au tiers et à la demi-saturation en sulfate d'ammonium à partir du sérum de Lapin et de Cheval après action de doses variées de ninhydrine.

1° *Sérum de Lapin*

Un sérum de Lapin est divisé en échantillons identiques dilués au demi; ces derniers sont additionnés de doses variées de solution de ninhydrine à 1 p. 100. Après séjour d'une demi-heure à 37° C, les divers échantillons sont complétés à un même volume à l'aide d'eau physiologique tamponnée (dilution du sérum au tiers).

Chacun des échantillons ainsi traités est alors divisé en deux parts; la première part est saturée au tiers de sulfate d'ammonium, la seconde est saturée au demi; sur la fraction protéidique ainsi précipitée, on effectue le dosage des protéines.

Le tableau XXVI rend compte des mélanges effectués et, en outre, des protéines précipitées par le sulfate d'ammonium au tiers et à demi-saturation à partir de 100 cm^3 de sérum traité par des doses variées de ninhydrine.

Ces courbes mettent bien en évidence le fait que, sous l'influence exercée par la ninhydrine, la quantité de protéines totales précipitées par le sulfate d'ammonium à demi-saturation (fraction désignée habituellement sous le nom de globulines totales, Hofmeister [113]) augmente très rapidement avec la concentration en ninhydrine mise en jeu; cependant, lorsque cette concentration a atteint un certain taux, la quantité de protéines insolubilisées reste stationnaire.

TABLEAU XXVI

N°	Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par 100 cm³ de sérum traité	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation (g.)	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéines précipitées entre le 1/3 et la 1/2 saturation (g.)
1	0	2,29	3,80	1,51
2	40	2,41	3,95	1,54
3	80	2,75	3,95	1,20
4	120	2,87	3,99	1,12
5	200		5,19	
6	300	3,30	5,25	1,95

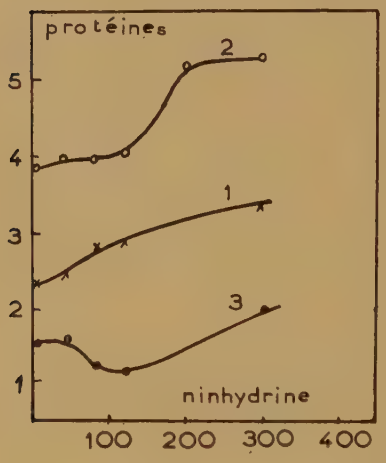


FIG. 13.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines (g) précipitées de 100 cm³ de sérum de Lapin par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (courbe 1), à la demi-saturation (courbe 2) et entre le tiers et la demi-saturation (courbe 3) en fonction du poids de ninhydrine (mg pour 100 cm³ de sérum).

A ce tableau correspondent les courbes de la figure 13.

La fraction précipitant au tiers de saturation en sulfate d'ammonium et désignée habituellement sous le nom d'euglobulines (FULD et SPIRO [78], PORGES et SPIRO [212]) augmente également avec la concentration en ninhydrine.

Enfin, la fraction qui précipite entre le tiers et la demi-saturation (pseudo-globulines selon PORGES, FULD et SPIRO [212, 78]) présente une solubilité plus grande, tandis qu'augmente la dose de ninhydrine mise en jeu; mais à partir d'une certaine concentration en ce réactif, un phénomène inverse apparaît,

2° *Sérum de Cheval*

Avec du sérum de Cheval, nous avons effectué une expérience identique en tous points à celle précédemment décrite à propos du sérum de Lapin. Seules les doses de ninhydrine mises en jeu ont été un peu plus élevées.

Le tableau XXVII consigne les résultats obtenus dans l'un de nos essais.

TABLEAU XXVII

N°	Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par 100 cm³ de sérum traité	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation (g.)	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéines précipitées entre le 1/3 et la 1/2 saturation (g.)
1	0	1,47	4,93	3,46
2	250	3,74	5,65	1,91
3	330	4,04		
4	500	4,69	6,03	1,34
5	750	4,69	6,95	2,26
6	1000	4,66	6,86	2,20

A ce tableau correspondent les courbes de la figure 14.

Il ressort de ces expériences que les protéines du sérum de Cheval se conduisent vis-à-vis de la ninhydrine comme celles du sérum de Lapin.

Les remarques faites précédemment peuvent être répétées ici. Cependant, les modifications apportées à la solubilité des protéines ne correspondent pas pour les deux espèces à des concentrations identiques en ninhydrine.

Ces deux séries d'expériences mettent donc en évidence deux phénomènes essentiels :

1° Chez le Lapin comme chez le Cheval, la fraction protéidique précipitée par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation et correspondant habituellement aux euglobulines devient plus abondante au fur et à mesure que croît la quantité de

ninhydrine mise en jeu; d'autre part, la quantité de protéine précipitée entre le tiers et la demi-saturation en sulfate d'ammonium (pseudoglobulines) diminue avec la concentration en ninhydrine, et cela pour une certaine zone de concentration en ninhydrine. Euglobulines et pseudoglobulines se conduisent donc d'une façon différente vis-à-vis de la ninhydrine.

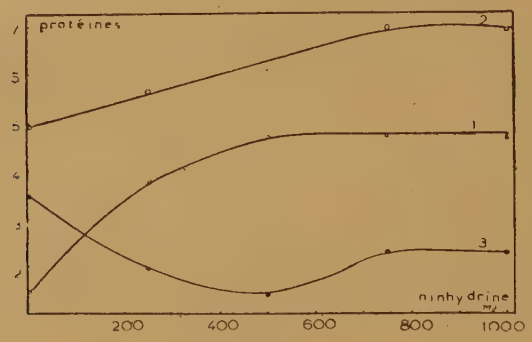


Fig. 14.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines (g) précipitées de 100 cm³ de sérum de Cheval par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (courbe 1), à la demi-saturation (courbe 2) et entre le tiers et la demi-saturation (courbe 3) en fonction du poids de ninhydrine (mg pour 100 cm³ de sérum).

2° Le sérum de Lapin se montre beaucoup plus sensible que le sérum de Cheval à l'action de la ninhydrine. A des modifications identiques de la solubilité des protéines sériques chez ces deux espèces correspondent deux concentrations différentes en ninhydrine.

Ces deux constatations apportent des arguments en faveur de l'hypothèse que nous avons émise : les euglobulines, surtout celles du Lapin (qui contiennent la majorité des anticorps pour les systèmes immunologiques que nous avons étudiés), se montrent beaucoup plus sensibles à l'action de la ninhydrine que les pseudoglobulines, surtout celles du Cheval (chez lesquelles se trouvent les anticorps pour les systèmes immunologiques que nous avons étudiés).

C. — Fractions protéidiques des sérums traités par la ninhydrine pendant des temps variés

Cherchant toujours à préciser la sensibilité différente des fractions euglobulines et pseudoglobulines du Lapin et du Cheval, nous avons étudié l'influence jouée sur l'obtention de ces deux fractions protéidiques par le temps pendant lequel la ninhydrine agit sur le sérum. Nous avions constaté précédemment, en effet, que le facteur temps de contact influence considérablement le phénomène que nous étudions.

1° *Sérum de Lapin*

Un certain nombre d'échantillons de sérum de Lapin dilués au demi sont traités par une même dose de ninhydrine (0,10 cm³ de la solution de ninhydrine à 1 p. 100 par cm³ de sérum), et laissés à 37° C pendant des temps variables. Les échantillons ainsi traités sont alors divisés en deux parts : l'une de ces parts est saturée au tiers, à l'aide de sulfate d'ammonium, l'autre est saturée au demi. Sur les fractions précipitées, on effectue le dosage des protéines.

Le tableau XXVIII rend compte des mélanges effectués et des résultats obtenus.

TABLEAU XXVIII

N°	Temps de contact à 37° C entre la ninhydrine et le sérum	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation (g.)	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéines précipitées entre le 1/3 et la 1/2 saturation (g.)
1	quelques sec.	0,58	1,52	0,94
2	1 heure	1,12	1,86	0,74
3	2 h. 30	1,13	1,90	0,77
4	4 h. 30	1,14		
5	6 h. 30	1,13	1,90	0,77
6	8 h. 30	1,16	1,92	0,76

A ces résultats correspondent les courbes de la figure 15.

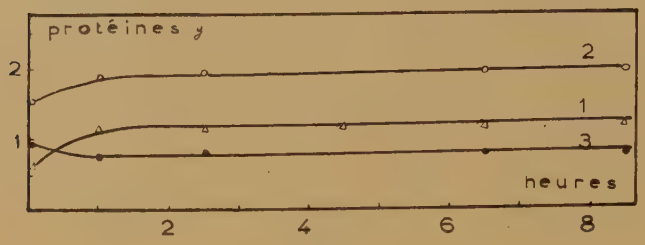


Fig. 15.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines (g) précipitées de 100 cm³ de sérum de Lapin par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (courbe 1), à la demi-saturation (courbe 2) et entre le tiers et la demi-saturation (courbe 3) en fonction du temps d'action de la ninhydrine.

Ces courbes montrent que le facteur temps d'action de la ninhydrine sur les protéines exerce une influence sur la solubilité de ces dernières. Cette influence est cependant assez limitée.

Un autre fait apparaît encore : c'est le comportement particulier de la fraction correspondant aux pseudoglobulines : alors que les globulines totales et la fraction correspondant aux euglobulines voient diminuer leur solubilité avec le temps d'action de la ninhydrine, l'inverse se produit pour la fraction pseudoglobulines.

2° *Sérum de Cheval*

Pour notre expérience sur le sérum de Cheval, nous utilisons une dose de ninhydrine plus élevée (0,48 cm³ de solution de ninhydrine à 1 p. 100 par cm³ de sérum traité). Le même mode opératoire que précédemment a été utilisé. Le tableau XXIX rassemble nos résultats.

Avec le sérum de Cheval, le phénomène se montre beaucoup plus net encore. Alors que la fraction correspondant aux euglobulines devient plus abondante au fur et à mesure qu'augmente le temps du contact entre la ninhydrine et le sérum, l'inverse se produit pour la fraction correspondant aux pseudoglobulines.

TABLEAU XXIX

N°	Temps de contact à 37° C entre la ninhydrine et le sérum	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation (g.)	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéines précipitées entre le 1/3 et la 1/2 saturation (g.)
1	quelques sec.	1,56	4,87	3,71
2	1 heure	3,26		
3	2 h. 30	3,74	5,86	2,12
4	4 h. 30	4,04	5,78	1,74
5	6 h. 30	4,08	6,07	1,99
6	8 h. 30	4,21	6,29	2,08

A ce tableau correspondent les courbes de la figure 16.

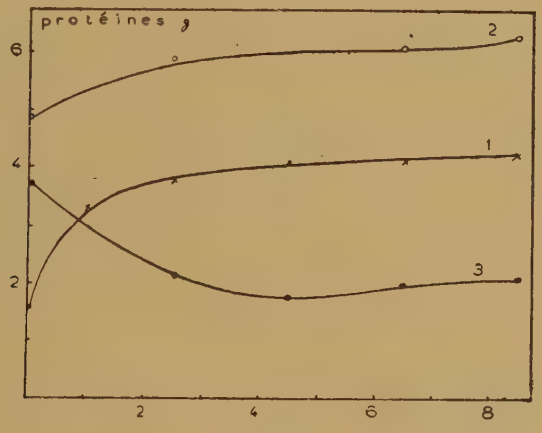


FIG. 16.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines (g) précipitées de 100 cm³ de sérum de Cheval par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (courbe 1), à la demi-saturation (courbe 2) et entre le tiers et la demi-saturation (courbe 3) en fonction du temps d'action de la ninhydrine.

Une autre constatation ressort encore de nos essais : c'est la grande sensibilité du sérum de Lapin vis-à-vis de la ninhydrine. Lorsque la ninhydrine a agi sur le sérum de Lapin pendant une heure, le phénomène n'évolue plus; avec le sérum de Cheval, il faut un temps de contact de plusieurs heures, bien que la dose de ninhydrine mise en jeu soit beaucoup plus élevée avec le sérum de Cheval qu'avec celui de Lapin.

Toutes ces constatations confirment les conclusions que nous avons déjà émises et mettent en évidence le comportement différent des fractions protéidiques du sérum sous l'influence de la ninhydrine.

Remarque.

Si les expériences que nous venons d'exposer montrent nettement le comportement différent des fractions protéidiques traitées par la ninhydrine, elles ne se prêtent guère parfaitement à l'interprétation des phénomènes immunologiques que nous avons mis en évidence. En effet, dans nos expériences ayant consisté à étudier l'action de la ninhydrine sur la floculation des immunsérums de Cheval et de Lapin, le réactif a généralement agi pendant des temps variables; la ninhydrine est restée en contact avec les protéines pendant une demi-heure, puis elle a réagi de nouveau pendant la période s'écoulant entre la préparation du mélange antigène-anticorps et la floculation; or, comme dans nos expériences nous avons constaté que le temps de floculation dépendait de la concentration en ninhydrine mise en jeu et du temps pendant lequel ce réactif a réagi sur le sérum, nous ne pouvons transposer dans le domaine immunologique nos expériences physicochimiques que si nous faisons agir la ninhydrine sur les sérums pendant une demi-heure à laquelle s'ajoutera le temps correspondant à la floculation d'un sérum donné et pour une concentration en ninhydrine également donnée.

1° *Sérum de Lapin*

Pour réaliser ces expériences, nous avons mis en jeu le mode opératoire des essais précédents, mais cette fois les mélanges sont restés à 37° C pendant des temps variables.

Le tableau XXX renseigne sur les diverses concentrations en ninhydrine et sur les temps de contact; il indique également les résultats que nous avons obtenus pour la précipitation des protéines par le sulfate d'ammonium au tiers et à la demi-saturation.

TABLEAU XXX

N°	Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par 100 cm³ de sérum traité	Temps d'action de la ninhydrine	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation (g.)	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéines précipitées entre le 1/3 et la 1/2 saturation (g.)
1	0	1 h. 13	1,0	2,83	1,83
2	40	60 minutes	1,40	3,30	1,90
3	80	50 —	1,78	3,50	1,72
4	120	45 —	1,90	3,74	1,84
5	200	35 —	2,00	3,88	1,88
6	300	35 —	2,25	4,50	2,25

Au tableau XXX correspondent les courbes de la figure 17.

Nous retrouvons encore cette fois des constatations du même ordre que celles précédemment exposées. Signalons que la fraction précipitant au tiers de saturation en sulfate d'ammonium, celle qui chez le Lapin contient la presque totalité des anticorps, voit sa solubilité considérablement diminuée.

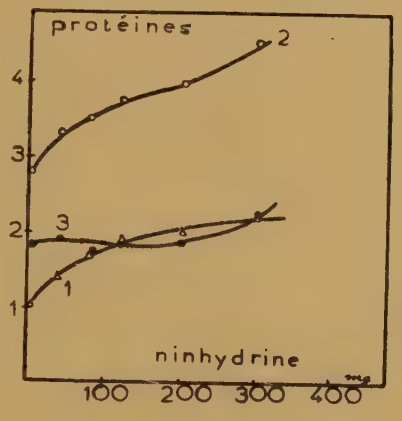


FIG. 17.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines (g) précipitées de 100 cm³ de sérum de Lapin par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (courbe 1), à la demi-saturation (courbe 2) et entre le tiers et la demi-saturation (courbe 3) en fonction du poids de ninhydrine (mg) mis en jeu.

2° *Sérum de Cheval*

Ici encore, nous mettons en jeu le même mode opératoire; dans le tableau XXXI se trouvent réunis nos conditions d'expériences et les résultats obtenus.

TABLEAU XXXI

N°	Poids de ninhydrine (mg.) mis en jeu par 100 cm³ de sérum traité	Temps d'action de la ninhydrine	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium au 1/3 de saturation (g.)	Protéines précipitées de 100 cm³ de sérum par le sulfate d'ammonium à 1/2 saturation (g.)	Protéines précipitées entre le 1/3 et la 1/2 saturation (g.)
1	0	49 minutes	1,39	6,29	4,90
2	160	55 —	3,40	7,26	3,86
3	330	66 —	4,14	7,60	3,46
4	500	82 —	5,00	7,97	2,97
5	750	104 —	5,74	8,40	2,66
6	1000	125 —	6,13	8,80	2,67

Au tableau XXXI correspondent les courbes de la figure 18.

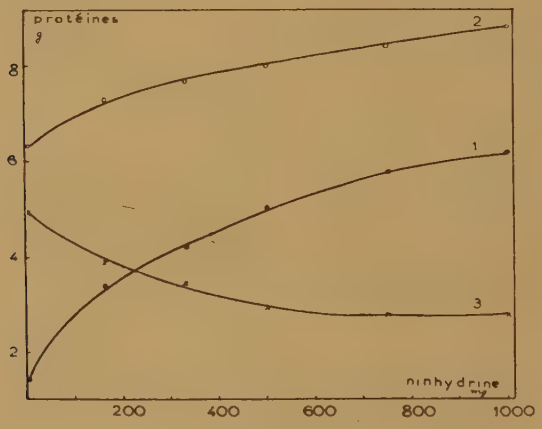


FIG. 18.

Courbes représentatives des variations du poids de protéines (g) précipitées de 100 cm³ de sérum de Cheval par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation (courbe 1), à la demi-saturation (courbe 2) et entre le tiers et la demi-saturation (courbe 3) en fonction du poids de ninhydrine (mg) mis en jeu.

Ici le phénomène est encore beaucoup plus net. Il permet de constater que si les protéines qui précipitent au tiers de saturation en sulfate d'ammonium voient leur solubilité diminuer au fur et à mesure qu'augmente la concentration en ninhydrine, les protéines qui précipitent entre le tiers et la demi-saturation, celles qui contiennent justement les anticorps que nous avons étudiés jusqu'ici, présentent, au contraire, une solubilité nettement augmentée.

Cette expérience, plus efficacement encore que les précédentes, plaide en faveur de l'hypothèse que nous avons émise au début : la ninhydrine diminue la solubilité des euglobulines sériques du Lapin, fraction qui, chez cet animal, contient la majorité des anticorps; elle augmente, au contraire, la solubilité des pseudoglobulines de Cheval, fraction où se localisent généralement les anticorps.

Toutes les expériences précédemment exposées ont été répétées à diverses reprises; d'autres concentrations en sulfate d'ammonium ont été étudiées : tous nos résultats convergent vers la même conclusion et c'est la raison pour laquelle, dans la plupart des cas, nous n'avons rapporté qu'un seul de nos essais, animée du souci de ne pas surcharger notre exposé.

D. — Action précipitante exercée par la ninhydrine sur les fractions protéidiques sériques

Eggerth [67] a déjà signalé que les diverses fractions protéidiques du sérum sanguin s'insolubilisent beaucoup plus facilement par abaissement du *p*H lorsqu'elles ont été préalablement traitées par la ninhydrine.

Nous avons vu également, au début de notre travail, que si la ninhydrine réagit sur les protéines pendant un temps suffisamment long, ces dernières finissent par précipiter sans que l'on soit obligé d'abaisser le *p*H du milieu (*).

Il nous a donc paru intéressant, dans une dernière série d'essais, d'étudier, en fonction du temps, le comportement des diverses fractions protéidiques soumises à des doses variées de ninhydrine.

Pour réaliser cet essai, nous avons isolé les euglobulines (**), les pseudoglobulines et les albumines d'un sérum de Lapin et d'un sérum de Cheval.

(*) Notons qu'après action de la ninhydrine (qui bloque les fonctions aminées), une légère diminution du *p*H se produit quand même.

(**) Il s'agit ici des globulines selon Marcus [167] (voir page 95).

Nous avons dosé les protéines [165] dans chacune de ces fractions, ce qui nous a permis de les ramener au même titre (1,15 mg par cm^3), la concentration saline du milieu étant partout de 8 p. 1.000.

Chaque solution, aussi bien dans le cas du Lapin que dans celui du Cheval, est divisée en six parts égales; chaque part est traitée par une quantité différente de solution de ninhydrine et l'ensemble des échantillons est porté à l'étuve à 37° C. L'aspect des liquides est observé et les modifications apparentes sont notées en fonction du temps.

Le tableau XXXII rend compte des mélanges et de nos observations.

Cette série de constatations vient confirmer encore les résultats déjà établis : les euglobulines se montrent en général beaucoup plus sensibles que les pseudoglobulines à l'action de la ninhydrine. Les fractions protéidiques du Lapin sont généralement plus sensibles à l'action de la ninhydrine que celles du Cheval.

Signalons simplement que, pour les fractions globulines et pseudoglobulines, il existe une concentration optimum en ninhydrine pour laquelle la précipitation des protéines est maximum. Il nous semble intéressant de rapporter ce fait d'une constatation d'Eggerth [67] : pour des doses supérieures à 10 mg de ninhydrine par cm^3 de sérum, on observe une inhibition dans la vitesse d'apparition de la coloration bleue.

Il ressort de toutes les expériences précédemment exposées que la ninhydrine possède la propriété de diminuer la solubilité des fractions protéidiques les moins solubles; ces fractions sont justement celles qui contiennent la presque totalité des anticorps chez le Lapin. La ninhydrine possède, au contraire, la propriété d'augmenter très sensiblement la solubilité des pseudoglobulines, fraction protéidique qui supporte justement les anticorps chez le Cheval (*).

Enfin, le sérum de Cheval se montre beaucoup moins sensible à l'action de la ninhydrine que le sérum de Lapin.

Cette différence d'action de la ninhydrine, d'une part, sur les euglobulines et les pseudoglobulines sériques, d'autre part sur les sérums de Cheval et de Lapin, permet de comprendre le comportement différent des immunsérums traités par la ninhydrine chez ces deux animaux. Aussi, pendant longtemps,

(*) Voir page 96.

TABLEAU XXXII

Fractions	Ninhydrine (mg.) p. 1 cm³	DURÉE DES OBSERVATIONS													
		1 h.		2 h.		6 h.		12 h.		14 h.		24 h.		48 h.	
		L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C	L	C
Euglobulines	0,5	0	0	0	0	P	+	S	S	S	S	S	S	S	S
	1	+ +	0	P	0	P	P	S	S	S	S	S	S	S	S
	2	+ + + +		P	+ +	S	P	S	S	S	S	S	S	S	S
	3	+ + + +		+ +	+ +	P	+ +	S	S	S	S	S	S	S	S
	4	+	0	+ +	+	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	P	P	S	S
	5	0	0	0	0	0	0	+ +	+	+ +	+	P	P	P	P
Pseudoglobulines	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	S	0
	1	+	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+ +	0	S	0
	2	+	0	+ +	0	+ +	+	S	+	S	+	S	+ +	S	S
	3	+	+	+ +	+	P	+	S	+ +	S	+ +	S	+ +	S	S
	4	0	+	+ +	+	+ +	+	+ +	+ +	S	+ +	S	S	S	S
	5	0	+	0	+	+	+	+	+ +	+	+ +	+ +	+ +	S	S
Albumines	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	S	S	S	S
	4	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	S	S	S	S
	5	0	0	0	0	0	0	+	+	+	+	S	S	S	S
Sérum total	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	0	S	+
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	+	S	+
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	S	+ +	S	+ +
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	S	S	S	S
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	S	S	S	S
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	S	S	S	S

0 : limpide.
+ et + + : le nombre de croix est proportionnel à l'opalescence.
P : apparition d'une précipitation.
S : sédimentation du précipité.

nous avons pensé que ces modifications de solubilité suffisaient à expliquer les phénomènes immunologiques précédemment décrits. Il restait néanmoins à vérifier le bien-fondé de cette conception.

La bonne fortune d'avoir pu obtenir des immunsérums dans lesquels les anticorps étaient répartis dans les deux fractions euglobulines et pseudoglobulines, et la possibilité de préparer certains immunsérums de Cheval (ou de Mulet) dont les anticorps se trouvent dans les euglobulines, devaient nous permettre de réaliser cette vérification.

II. — VÉRIFICATION IMMUNOLOGIQUE DE L'HYPOTHÈSE PRÉCÉDENTE

Si l'hypothèse émise précédemment suffit à expliquer les phénomènes immunologiques que nous avons mis en évidence (à savoir qu'après action de la ninhydrine un immunsérum de Lapin floculе plus rapidement tandis qu'un sérum de Cheval voit, au contraire, sa floculation retardée), tous les anticorps précipitants euglobuliniques devraient floculer plus vite après action de la ninhydrine, tandis que les anticorps pseudoglobuliniques devraient floculer moins vite.

A. — Sérum de Lapin

Une première série d'essais a porté sur des immunsérums de Lapin (antidiphtériques) dont les anticorps se trouvaient répartis dans les deux fractions euglobulinique et pseudoglobulinique. Ces fractions ont été préparées par la technique de Marcus [167], modifiée par Quinan [214] (*); ces deux fractions sont amenées au même titre en protéines (0,8 mg par cm^3) et en sels (8 mg par cm^3). L'étude de la précipitation spécifique, effectuée selon la méthode de Dean et Webb, montre que la fraction « euglobulines » floculе dans la zone des proportions optima en huit heures; la fraction pseudoglobulines floculе dans cette même zone en quatre heures vingt.

Après quelques essais préliminaires, que nous ne rapportons pas ici, nous avons déterminé la quantité de ninhydrine que nous pouvions mettre en jeu; cette quantité est de 0,03 cm^3 de solution de ninhydrine à 1 p. 100 par cm^3 de

(*) Dialyse contre de l'eau distillée du précipité de globulines obtenues selon Hofmeister [113].

solution protéidique. Après action de la ninhydrine (une demi-heure à 37° C), la fraction euglobulines floculе en cinquante minutes, et la fraction pseudoglobulines en quatre-vingt-quinze minutes. Le gain observé est donc de 29 p. 100 pour les euglobulines et de 63 p. 100 pour les pseudoglobulines.

Ce gain est plus accentué pour la fraction euglobulines, la moins soluble, que pour la fraction pseudoglobulines; il convient néanmoins d'observer que, dans un cas comme dans l'autre, la floculation s'est trouvée très notablement accélérée.

Afin de rendre plus rigoureuse encore notre étude expérimentale, nous avons effectué une nouvelle série d'essais dans lesquels nous avons utilisé des fractions protéidiques ramenées non seulement au même titre en protéines et en sels, mais encore en anticorps. Pour cela, nous avons prélevé des volumes différents des deux fractions correspondant à une même teneur en anticorps; l'échantillon le moins riche en protéines était alors additionné d'une solution de protéines identiques, préparées avec le sérum d'un lapin non immunisé jusqu'à ce que la quantité de protéines soit la même dans les deux cas. A l'aide d'eau physiologique, chacun des deux échantillons était alors amené à un même volume. Nous disposions ainsi de deux fractions, euglobulines et pseudoglobulines, ayant le même titre en anticorps et aussi en protéines. Chacun des deux échantillons était enfin divisé en deux parts : l'une était traitée par la ninhydrine, l'autre servait de témoin.

Les euglobulines témoin mises en présence de leur antigène floculent en soixante minutes; après traitement par la ninhydrine, elles floculent en trente-cinq minutes, ce qui représente un gain de temps de 41 p. 100. Les pseudoglobulines témoin floculaient en trois heures vingt; après action de la ninhydrine, le floculat apparaît après une heure trente; le gain de temps est donc de 55 p. 100.

Dans cette expérience, le gain de temps est plus accentué avec les pseudoglobulines; quoi qu'il en soit, les deux fractions voient leur floculation spécifique accélérée après action de la ninhydrine.

Nous avons effectué beaucoup d'autres expériences avec le sérum de Lapin; tantôt la plus grande accélération intéressait les euglobulines, tantôt l'inverse se produisait; dans tous les cas, cependant, la floculation s'est trouvée accélérée.

Avant d'apporter une conclusion à ces essais, nous rapporterons nos expériences effectuées avec le sérum de Cheval.

B. — Sérum de Cheval

Les anticorps de Cheval, surtout lorsque l'antigène se trouve représenté par une protéine, sont généralement localisés dans la fraction pseudoglobulines. Cette constatation ne saurait cependant être généralisée et l'on observe parfois des sérums antidiphtériques de Cheval dans lesquels les anticorps se trouvent aussi bien dans la fraction euglobulines que dans les pseudoglobulines (Moerch [178]). Nous avons eu la chance de disposer d'un tel sérum; cela nous a permis de réaliser avec le sérum de Cheval des essais identiques aux précédents.

Cette fois, nous avons utilisé trois concentrations différentes en sulfate d'ammonium (0,31, 0,39 et 0,50 saturation). Comme dans l'essai précédemment décrit, nous avons amené chaque fraction à la même teneur en anticorps et en protéines, en mettant en jeu comme précédemment des protéines correspondantes non immunes. Finalement, nous avons obtenu trois fractions titrant chacune 61 unités antidiphtériques et 15,10 mg de protéines par cm^3. Chacune de ces fractions était divisée en deux parts; tandis que l'une d'elles était soumise à l'action de la ninhydrine (0,04 cm^3 de solution à 1 p. 100 par cm^3 de sérum traité) (*), l'autre servait de témoin.

Les trois fractions témoins, obtenues respectivement à des taux de saturation en sulfate d'ammonium de 0,31, 0,39 et 0,50, floculent en cinquante, trente-six et soixante-neuf minutes; les fractions correspondantes traitées par la ninhydrine floculent en soixante-sept, quarante-huit et quatre-vingt-huit minutes. Le pourcentage d'augmentation du temps de floculation est donc de 34, 33 et 15.

Ces trois fractions se conduisent donc différemment au point de vue immunologique après action de la ninhydrine, mais toutes se trouvent néanmoins retardées.

La modification de solubilité apportée par la ninhydrine aux protéines anticorps ne permet donc pas d'expliquer, contrairement à notre hypothèse, les phénomènes immunologiques précédemment exposés.

On se rendra définitivement compte de cet état de choses à la suite d'une dernière expérience.

(*) Comme précédemment, la ninhydrine agit sur le sérum dilué au demi.

C. — Ninhydrine et système polyholoside du charbon - antisérum de Mulet

Si les anticorps antitoxiques de Cheval se trouvent presque toujours supportés par la fraction pseudoglobulines, il n'en est pas de même pour les anticorps antipolyholosides microbiens. Dans ce dernier cas, les anticorps sont localisés dans les euglobulines (Grabar et Staub [89]) ; le sérum de Mulet se conduit, à ce point de vue, comme celui du Cheval [248].

Nous avons pu disposer d'un sérum de Mulet antipolyholoside du charbon ; ce sérum, mis en présence de son antigène, flocule (zone de primofloculation) en cinq minutes ; après action de la ninhydrine (0,10 cm^3 de solution de ninhydrine à 1 p. 100 par cm^3 de sérum), il flocule en vingt minutes. Nous voyons donc que la floculation s'est trouvée retardée bien que les anticorps soient de nature euglobulinique.

Il résulte de cette constatation que, contrairement à l'hypothèse que nous avions émise, l'action différente exercée par la ninhydrine sur les immunsérums de Lapin et de Cheval ne saurait être rattachée à la localisation différente des anticorps chez ces deux espèces animales.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

Nous avons constaté, dans les chapitres précédents, que la ninhydrine, agissant sur les anticorps précipitants dans des conditions que nous avons précisées, accélère la vitesse de floculation des immunsérums de Lapin et retarde au contraire celle des immunsérums de Cheval. Pour tenter d'expliquer cette différence d'action de la ninhydrine, nous avons supposé que ce réactif devait agir différemment et peut-être même d'une façon opposée, sur les fractions euglobulines (qui chez le Lapin supportent les anticorps) et pseudoglobulines (qui chez le Cheval contiennent les anticorps).

Nous avons prouvé, à la suite de diverses séries d'expériences, que la ninhydrine agissait effectivement d'une façon différente et parfois même opposée sur ces deux fractions protéidiques : la ninhydrine diminue la solubilité des euglobulines, elle augmente au contraire celle des pseudoglobulines dans les solutions de sulfate d'ammonium.

Nous avons cherché ensuite à savoir si cette différence d'action de la ninhydrine sur la solubilité des euglobulines et des pseudoglobulines suffisait à expliquer le comportement des immunsérums de Lapin et de Cheval vis-à-vis de ce réactif.

Pour effectuer cette étude, nous avons mis en jeu des sérums dont les anticorps étaient répartis dans les diverses fractions globuliniques. Nous avons pu ainsi étudier, pour un même sérum, l'action de la ninhydrine sur les anticorps euglobuliniques et pseudoglobuliniques. Il résulte de notre étude que la ninhydrine accélère toujours la floculation des anticorps précipitant de Lapin, quelle que soit la localisation de ces anticorps, et qu'au contraire elle retarde toujours la précipitation des anticorps de Cheval, que ces dernières soient euglobuliniques ou pseudoglobuliniques. Nous avons enfin réalisé une nouvelle expérience qui confirme encore les précédentes et qui montre qu'un sérum de Mulet antipolyholoside du charbon, dont les anticorps sont pourtant de nature euglobulinique, subit un retard de son pouvoir floculant lorsqu'il a été préalablement soumis à l'action de la ninhydrine.

Il résulte de cet ensemble de faits que les modifications de solubilité apportées par la ninhydrine aux diverses protéines-anticorps ne suffisent pas à expliquer le comportement différent des immunsérums de Lapin et de Cheval vis-à-vis de ce réactif. D'autres modifications apportées aux sérums de Lapin et de Cheval par la ninhydrine doivent encore être envisagées (chapitres V, VI et VII).

CHAPITRE V

HYPOTHÈSE SUR LE « BLOCAGE » DES GROUPEMENTS IONISÉS DES PROTÉINES DU LAPIN ET DU CHEVAL

Nous avons montré, dans le précédent chapitre, que l'action différente exercée par la ninhydrine sur la solubilité des protéines de Lapin et de Cheval ne suffisait pas à expliquer le comportement opposé des immunsérums de ces deux espèces traités par ce réactif.

Nous nous sommes demandée si les fonctions amine dont se trouvent hérissées les molécules protéidiques ne pourraient pas permettre d'expliquer ce comportement différent. On peut supposer, en effet, que la ninhydrine, provoquant des modifications de structure dans les protéines, fasse apparaître des groupements aminés plus ou moins dissimulés dans la molécule, et cela d'une façon variée suivant les espèces, avant de les bloquer.

Quelques travaux ont déjà été effectués concernant l'action de la ninhydrine sur les protéines sériques d'espèces différentes (Dulière [61], Eggerth [67]); mais, dans tous ces travaux, les doses de ninhydrine mises en jeu sont très élevées et notablement supérieures à celles que nous employons. Les conclusions des auteurs précités ne peuvent donc, en aucun cas, servir à expliquer nos constatations.

Afin d'étudier l'action de la ninhydrine sur les fonctions amine des sérums de Cheval et de Lapin, nous avons fait agir ce réactif dans les conditions de nos expériences immunolo-

giques et nous avons étudié comparativement les protéines sériques de ces deux espèces.

Le dosage des fonctions amine libres des protéines préalablement traitées par la ninhydrine s'avère complexe. La technique classique de Sörensen [246], dont la titration s'effectue en présence de phtaléine du phénol, est pratiquement irréalisable en raison de la coloration bleue due à l'action de la ninhydrine; cette coloration empêche, en effet, de saisir le virage de l'indicateur. Pour la même raison, la technique photométrique de Loiseleur et Thillard [152] doit être rejetée.

Pour éviter ces inconvénients, nous avons effectué nos titrations en suivant le *p*H de nos milieux. Cette technique, cependant, n'est pas absolument exempte de critique, car les auteurs ne sont pas tout à fait d'accord sur le mode d'action exercé par la ninhydrine sur les molécules de protéines.

Lorsque l'on fait agir la ninhydrine sur le sérum, celle-ci réagit également avec les aminoacides libres; la réaction provoque ainsi le départ d'anhydride carbonique et d'ammoniaque qui s'éliminent plus ou moins du milieu réactionnel et qui risquent de venir interférer dans le dosage, selon Sörensen.

Les aminoacides libres des sérums sont cependant peu abondants; la ninhydrine agit surtout sur les groupes ω aminés des protéines [30], et le dégagement d'anhydride carbonique, dans ce cas, n'a pas lieu (voir p. 43). La technique de Sörensen complétée par l'électrotitration nous semble donc devoir convenir, compte tenu des réserves précitées.

La méthode de Van Slyke [286] qui consiste à mesurer le volume de l'azote dégagé après action de l'acide nitreux constitue généralement la méthode de choix pour le dosage des groupements aminés dans les molécules protéidiques. Dans nos expériences mettant en jeu de très faibles doses de ninhydrine, le nombre de fonctions aminées bloquées est relativement minime et les différences des résultats que l'on peut trouver d'une expérience à l'autre sont parfois d'un ordre de grandeur comparable à l'erreur relative de la méthode.

Afin d'avoir une idée sur le pourcentage des groupements aminés bloqués par la ninhydrine chez le Lapin et chez le Cheval, nous avons effectué un grand nombre d'expériences comparatives en faisant varier la quantité de ninhydrine mise en jeu, le temps de contact entre le réactif et les sérums, etc.

I. — ÉTUDE COMPARATIVE DU BLOCAGE DES FONCTIONS AMINE PAR LA NINHYDRINE SUR LES SÉRUMS DE LAPIN ET DE CHEVAL.

Pour effectuer cette étude, nous avons mis en œuvre le protocole expérimental suivant :

Divers échantillons identiques de sérum dilué au demi sont traités pendant une demi-heure à 37° C, par des quantités variées de ninhydrine; on prend le *p*H de chaque échantillon; cette mesure donne déjà une idée sur l'importance du nombre de fonctions amine bloquées. Plus ce nombre est grand, plus le *p*H du milieu baisse. Les résultats ci-dessous, correspondant à 20 cm³ de sérum de Cheval au demi traités par 10 cm³ de solution de ninhydrine de titre varié, rendent compte des variations du *p*H.

TABLEAU XXXIII

Poids de ninhydrine (mg) par cm³ de sérum pur	*p*H
0	8,15
1	7,71
2	7,40
3	7,26
3,5	7,90
4	7,40
4,5	6,99
5	6,92

A l'aide de soude N/5, le *p*H du milieu est ramené aux environs de 9,5 (virage net de la phtaléine du phénol) ; la

quantité de soude à ajouter est évidemment d'autant plus élevée que le *p*H du milieu était descendu plus bas. La soude ajoutée donne une idée sur les fonctions acide apparues à la suite du « blocage » des fonctions amine et rend compte, elle aussi, des fonctions amine bloquées. A ce moment, nous ajoutons dans chaque milieu un même volume de formol exactement neutralisé; les groupements aminés non attaqués par la ninhydrine subissent l'action du formol; le milieu s'acidifie. Les variations du *p*H rendent compte alors de l'abondance de ces fonctions amine non bloquées par la ninhydrine. On conçoit donc que, plus la quantité de ninhydrine primitivement ajoutée à l'échantillon est élevée, moins l'action du formol se montre efficace. Les résultats suivants montrent les *p*H des divers échantillons de sérum traités par la ninhydrine, ramenés ensuite par additions de soude à *p*H 9,5, puis traités par le formol.

TABLEAU XXXIV

Poids de ninhydrine (mg) par cm³ de sérum pur	*p*H
0	6,72
1	6,84
2	7,03
3	7,17
3,5	7,37
4	7,52
4,5	7,47
5	7,57

On s'attendrait donc à pouvoir doser titrimétriquement les fonctions amine non bloquées par la ninhydrine, en calculant la quantité de soude nécessaire pour ramener le *p*H à son point de départ, c'est-à-dire à *p*H 9,5.

Ce dosage n'est pas réalisable, car, contrairement à ce que l'on penserait trouver, la quantité de soude à ajouter n'est pas proportionnelle à l'écart entre le *p*H obtenu et 9,5. Il y a là un phénomène chimique qui mériterait d'être étudié : formation de substances tampon ? réaction entre le formol et le colorant ?

En raison de cette constatation, nous nous sommes contentée, dans nos expériences, de mesurer les deux séries de *p*H : la première nous renseigne sur l'abondance des groupements aminés bloqués par la ninhydrine : plus le *p*H est bas, plus le nombre de groupements bloqués est élevé; la seconde nous donne une idée sur le nombre de groupements aminés respectés par la ninhydrine : plus le *p*H est bas, moins la ninhydrine a bloqué de fonctions amine.

Nous avons donc effectué des expériences comparatives avec le sérum de Cheval et le sérum de Lapin. Afin d'éviter une interférence éventuelle des petites molécules d'aminoacides libres, les deux sérums étaient préalablement soumis à la dialyse contre de l'eau physiologique fréquemment renouvelée, puis ramenés exactement au même titre en protéines, soit 55,5 g par litre. Un dosage préalable de l'azote aminé selon Sörensen, indique 0,56 g par litre pour le sérum de Lapin et 0,57 g pour le sérum de Cheval. Chacun de nos échantillons, pour les mesures, contenait 5 cm^3 de sérum dilué au demi. Le tableau XXXV indique les résultats obtenus dans l'une de nos expériences.

TABLEAU XXXV

Poids de ninhydrine (mg.) par cm^3 de sérum pur	1re série		2e série	
	Lapin	Cheval	Lapin	Cheval
0	7,11	7,17	6,99	6,75
0,4	7,04	7,10	7,04	6,82
1,2	6,95	7,02	7,14	6,90
3	6,86	6,90	7,35	7,19
10	6,35	6,39	8,15	8,16
40	5,97	5,75	8,55	8,53

Les courbes 19 et 20 correspondant à ces résultats sont pratiquement superposables si l'on tient compte des erreurs expérimentales possibles. Il n'y a donc pas de différence vraiment notable de comportement entre les sérums de Cheval et de Lapin traités par la ninhydrine.

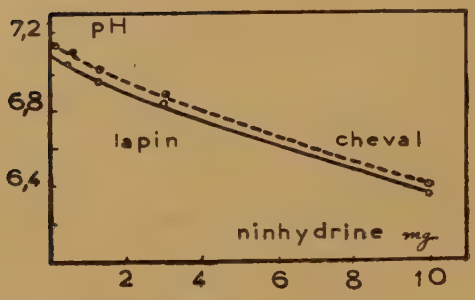


Fig. 19.

Courbes représentatives des variations du *p*H des sérums en fonction de la concentration en ninhydrine (mg par cm³ de sérum). (Cas du Cheval et du Lapin.)

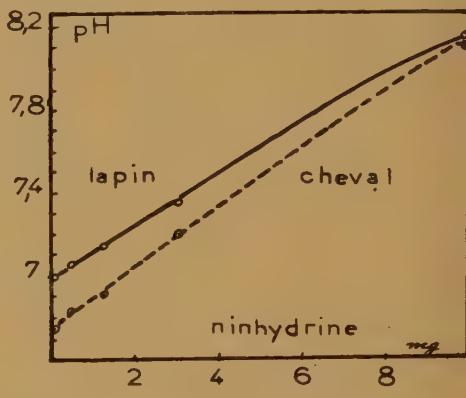


Fig. 20.

Courbes représentatives des variations d *p*H des sérums (après addition d'un même quantité de formol) en fonction d la concentration en ninhydrine (mg pa cm³ de sérum). (Cas du Cheval et d Lapin.)

Remarque. — Pour entraîner la conviction sur le rôle insignifiant joué par les groupements amine des protéines dans le phénomène que nous étudions, il conviendrait de faire réagir la ninhydrine plus longtemps que nous ne l'avons fait. Il convient, en effet, de constater que, dans nos expériences immunologiques, la ninhydrine a continué à réagir pendant que s'effectuait la réaction antigène - anticorps. Une étude comparative effectuée sur le sérum de Lapin et celui de Cheval et au cours de laquelle la ninhydrine a réagi pendant des temps variables, a été effectuée. Les deux courbes obtenues se montrent à peu près superposables.

Mettant en jeu la technique de Van Slyke [286], à laquelle nous avons fait allusion précédemment, nous avons effectué une étude comparative concernant l'action de la ninhydrine sur les sérums de Cheval et de Lapin.

Dans une première série d'expériences, nous avons étudié l'action exercée par des doses croissantes de ninhydrine sur

les fonctions amine. Pour cette étude, nous avons utilisé le mode opératoire décrit par EGGERTH [67] ; cette technique consiste à diluer au quart le sérum mis en jeu avec de l'eau physiologique tamponnée à *p*H 7,5, puis à faire agir la ninhydrine en solution à 1 p. 100. Au lieu de laisser en contact le réactif et le sérum pendant cinq à neuf heures, comme le fait EGGERTH, nous nous sommes contentée d'une demi-heure de contact, afin de nous placer dans les conditions de nos essais immunologiques (*).

Voici nos résultats :

TABLEAU XXXVI

Sérum de Lapin		Sérum de Cheval	
Poids de ninhydrine (mg.) par cm^3 de sérum	Azote aminé (en mg.) par cm^3 de sérum (**)	Poids de ninhydrine (mg.) par cm^3 de sérum	Azote aminé (en mg.) par cm^3 de sérum (**)
0	0,83	0	0,77
2,4	0,72 (13 p. 100)		
4,0	0,70 (15 p. 100)	5	0,66 (15 p. 100)
6,0	0,67 (18 p. 100)	7	0,59 (23 p. 100)
10	0,59 (27 p. 100)	10	0,56 (27 p. 100)

Au tableau correspondent les courbes de la figure 21.

Les deux courbes sont extrêmement voisines et montrent que l'action exercée par la ninhydrine sur les sérums de Lapin et de Cheval est tout à fait comparable.

Pour préciser encore ce résultat, nous avons réalisé une

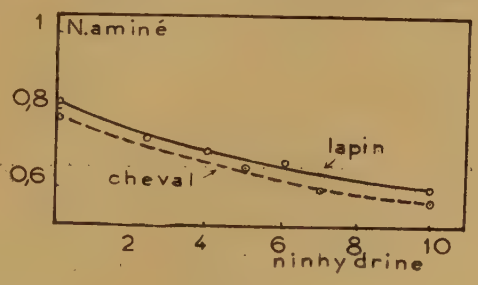


FIG. 21.

Courbes représentatives des variations de la quantité d'azote aminé en fonction du poids de ninhydrine (mg par cm^3 de sérum) mis en jeu. (Cas du Cheval et du Lapin.)

(*) Avant l'expérience, les deux sérums avaient été ramenés au même titre en protéines [165].

(**) Les chiffres entre parenthèses indiquent le pourcentage de l'azote aminé bloqué.

dernière série d'essais dans laquelle nous avons étudié l'action exercée par la ninhydrine (*) en fonction du temps de contact entre le sérum et ce réactif.

Le tableau XXXVII rassemble nos résultats.

TABLEAU XXXVII

Sérum de Lapin		Sérum de Cheval	
Temps de contact	Azote aminé (mg.) par cm^3 de sérum	Temps de contact	Azote aminé (mg.) par cm^3 de sérum
0	0,82	0	0,73
2 h.	0,77 (5 p. 100)	2 h.	0,70 (3,1 p. 100)
4 h.	0,80 (2,2 p. 100)	5 h.	0,70 (3,1 p. 100)
7 h.	0,74 (9 p. 100)	7 h.	0,69 (6,3 p. 100)

La précision très relative de la méthode ne permet pas de conclure qu'il existe de différence réellement notable entre l'action exercée par la ninhydrine sur les groupements aminés des protéines sériques de Lapin et celle produite par ce même réactif avec le sérum de Cheval.

Nous avons effectué bien d'autres expériences que nous ne rapporterons pas afin de ne pas surcharger notre texte. Toutes ont montré une sensibilité identique des groupements aminés vis-à-vis de la ninhydrine, qu'il s'agisse des protéines sériques du Lapin ou bien de celles du Cheval.

II. — ÉTUDE ÉLECTROPHORÉTIQUE DES PROTÉINES DE LAPIN ET DE CHEVAL TRAITÉES PAR LA NINHYDRINE.

Nous avons eu l'occasion de signaler à plusieurs reprises les doutes qui planent encore en ce qui concerne l'action exacte exercée par la ninhydrine vis-à-vis des protéines. Si le « blocage » des fonctions ω aminées [30] et des groupements -SH [270, 221] représentent des points certains, bien d'autres réactions chimiques peuvent encore avoir lieu (voir pages 42

(*) 0,10 cm^3 de solution de ninhydrine à 1 p. 100 par cm^3 de sérum.

et 43). Nous avons donc pensé que nous pourrions mesurer globalement le degré d'ionisation des diverses fractions protéidiques en effectuant une comparaison entre les diagrammes électrophorétiques des sérums traités ou non par la ninhydrine, dans le cas du Lapin et dans celui du Cheval.

Pour réaliser cette étude, l'appareil de Moore et White (Perkin-Elmer, constructeur) a été utilisé (*). Nous avons effectué sur une trentaine d'échantillons de sérums de Lapin et de Cheval, traités ou non par la ninhydrine, deux séries d'essais : l'une à *p*H 8,55, l'autre à *p*H 7,5.

L'examen détaillé de nos diagrammes ne nous permet pas de poser des conclusions bien nettes; la pique correspondant généralement aux β-globulines est dans la plupart des cas un peu plus élevée après le traitement par la ninhydrine; le sérum de Lapin se montre à ce point de vue plus sensible que le sérum de Cheval. L'électrophorèse nous permet donc tout simplement de confirmer ce que notre étude sur la solubilité des protéines « ninhydrinisées » ou non avait déjà établi, à savoir la plus grande sensibilité du sérum de Lapin vis-à-vis de la ninhydrine. Cette constatation ne saurait évidemment expliquer la différence d'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums de Lapin et de Cheval.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

Il ressort de cette étude comparative que l'action exercée par la ninhydrine sur les fonctions amine des protéines sériques se montre identique qu'il s'agisse du Cheval ou du Lapin.

Les groupements amine des protéines anticorps sur lesquels réagit la ninhydrine ne permettent donc pas non plus d'expliquer la différence de comportement des immunsérums de Cheval et de Lapin vis-à-vis de ce réactif. Ce résultat doit être rapproché des constatations de Sandor et Goldie [233] qui, à la suite d'une étude mettant en jeu l'action du cétène sur les protéines anticorps, avaient conclu à la non intervention des fonctions amine dans les propriétés immunologiques des immunsérums.

(*) Nous remercions beaucoup le Docteur Rebeyrotte, de l'Institut Pasteur de Paris, qui a bien voulu nous faire profiter de sa compétence pour l'établissement et l'interprétation des diagrammes électrophorétiques.

La ninhydrine exerce certainement sur les protéines anticorps du Lapin des modifications autres que le blocage des groupements $-NH_2$, car les réactifs dits spécifiques de ces fonctions exercent une action parallèle, sinon identique, sur les immunsérums précipitants de Cheval et de Lapin; c'est le cas pour le formol (Neuzil et Pautrizel [184]), le cétène (Sandor et Goldie [233]), le monobromacétate (Pautrizel et Tayeau [201, 268]), l'alloxane (Tayeau et Neuzil [266]), etc.

Une étude comparative des diagrammes électrophorétiques des sérums de Lapin et de Cheval traités ou non par la ninhydrine n'a pas montré non plus de différence d'action bien nette entre les sérums de ces deux espèces.

CHAPITRE VI

ROLE ÉVENTUEL DE DIVERSES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES

Dans tous les chapitres qui précèdent, nous avons étudié comparativement chez le Lapin et chez le Cheval certaines propriétés physiques du sérum sanguin.

Dans le sérum de ces deux animaux, les propriétés étudiées se sont montrées très voisines et ne nous ont pas fourni la clé du problème que nous cherchons à résoudre.

Dans ce chapitre, nous nous contenterons de rassembler d'autres essais effectués et portant sur la fonction créée par l'action de la ninhydrine, sur le poids moléculaire des anticorps et sur le pouvoir rotatoire.

I. — ROLE JOUÉ PAR LA FONCTION ALDÉHYDE ÉVENTUELLEMENT CRÉÉE

Les groupements aldéhydiques qui se forment après action de la ninhydrine ne pourraient-ils pas être rendus responsables du phénomène immunologique que nous avons constaté ?

Pour étudier ce problème, il faut mettre en jeu une substance capable de réagir sûrement avec les éventuels groupements aldéhyde apparus sur les protéines. Le dimédon semble convenir pour cette étude (*).

Après avoir vérifié que le dimédon seul, agissant sur un immunsérum précipitant, ne modifie nullement le temps de

(*) Le dimédon est le diméthyl-dihydrorésorcinol.

floculation de ce sérum, nous avons fait agir cette substance sur l'immunsérum préalablement traité par la ninhydrine. A condition de ne pas mettre en œuvre des quantités de dimédon trop élevées (qui provoquent l'apparition de précipités non spécifiques), aucune modification notable n'apparaît dans le temps de floculation.

Une autre substance possède la propriété de réagir quantitativement avec les groupements aldéhyde, *l'acet-hydrazide*. Avec ce réactif, nous avons repris les recherches que nous avions effectuées avec le dimédon. Quelles que soient nos conditions d'expérience, nous sommes parvenue à la même conclusion que précédemment.

La présence éventuelle de groupements aldéhyde dans les molécules d'anticorps traitées par la ninhydrine ne saurait expliquer en rien le comportement immunologique différent des immunsérums de Lapin et de Cheval traités par ce réactif.

II. — NINHYDRINE ET POIDS MOLÉCULAIRE DES ANTICORPS

Il existe une différence importante entre les anticorps du Lapin et ceux du Cheval; cette différence réside dans leurs poids moléculaires : tandis que les anticorps du Lapin ont un poids moléculaire d'environ 150.000 [110, 280], ceux du Cheval pèsent 930.000 environ [124, 122]. Il existe cependant des exceptions à cette règle : c'est ainsi, par exemple, que l'antitoxine diphtérique de Cheval, dont nous nous sommes servie dans notre travail, ne pèse que 180.000 [194, 223].

Le sérum de Cheval en général et le sérum antidiphtérique en particulier contiennent, en outre, des fractions de poids moléculaire élevé, de l'ordre du million; ces fractions pourraient peut-être intervenir dans le phénomène de floculation : on sait, en effet, que l'addition de certaines protéines inertes à des mélanges antigène - anticorps modifie souvent le temps de floculation [171, 245].

Le poids moléculaire de la fraction protéidique joue un rôle important en ce qui concerne l'action de la ninhydrine, car plus une molécule est volumineuse, plus sa surface relative est petite. Cette différence de surface, même si elle est faible, peut refléter une réactivité différente. Afin de voir si cette différence de poids moléculaire peut permettre d'expliquer la différence de comportement des immunsérums de Lapin et de

Cheval, nous avons étudié l'action exercée par la ninhydrine sur de l'antitoxine diphtérique de Cheval à divers stades de sa protéolyse.

Essais préliminaires

Dans nos tout premiers essais, nous avons mis en jeu la technique de protéolyse des protéines sériques décrite par Tayeau, Breton et Buffe [256, 34]; nous avons dû assez rapidement abandonner cette technique, car le cyanure de potassium, utilisé par ces auteurs comme activateur enzymatique, vient interférer avec la ninhydrine (*). A la suite d'essais variés, nous avons utilisé comme activateur l'acide ascorbique (0,01 g pour 10 cm³) proposé par Reiss [222], qui n interfère pas avec l'action de la ninhydrine (**).

Nous avons utilisé le thymol comme antiseptique.

Expériences

Nos essais ont porté sur des pseudoglobulines antidiphtériques purifiées par dialyse : 40 cm³ de solution de pseudoglobulines à 5 p. 100 sont additionnés de 1 cm³ de nitrate de calcium à 10 p. 100, de 0,04 g d'acide ascorbique et de 1 g de pepsine (***). Le *p*H est alors amené aux environs de 2. La solution est divisée en divers échantillons placés à l'étuve à 37° C. Après des temps variables, les échantillons sont prélevés et amenés à *p*H 7,5 par addition de soude, ce qui provoque l'arrêt de la protéolyse. Un échantillon témoin a été placé à l'étuve dans les mêmes conditions, avec les mêmes réactifs, mais en l'absence de pepsine. Chaque échantillon a été débarrassé des protéines coagulées par centrifugation; la zone de primofloculation a été déterminée et l'action de la ninhydrine (0,20 cm³ de solution à 1 p. 100 par cm³) a été étudiée.

Les résultats que nous avons obtenus se trouvent consignés dans le tableau XXXVIII.

Cette expérience conduit à diverses conclusions :

1° Le sérum protéolysé floculе plus rapidement que le sérum initial; ce fait a déjà été signalé par Pope et Healey [211]; d'autre part, la zone de floculation se trouve élargie (Northrop [188]);

(*) Le cyanure ne constitue pas la seule substance empêchant l'action de la ninhydrine, le borate de sodium agit de même (Eggerth [67]) par formation de complexes [228].

(**) Nous avions préalablement vérifié que l'acide ascorbique n'exerçait aucune action réellement notable sur la floculation.

(***) Cachet B. D. H.

TABLEAU XXXVIII

Séjour à l'étuve : 3 jours				Séjour à l'étuve : 6 jours			
Sans pepsine (Témoin)		Avec pepsine		Sans pepsine (Témoin)		Avec pepsine	
Sans ninhydrine	Avec ninhydrine	Sans ninhydrine	Avec ninhydrine	Sans ninhydrine	Avec ninhydrine	Sans ninhydrine	Avec ninhydrine
55 minutes	71 minutes	40 minutes	44 minutes	60 minutes	77 minutes	50 minutes	53 minutes

2° Les protéines anticorps soumises à la protéolyse voient leur temps de floculation retardé par l'action de la ninhydrine.

Nous ne considérerons dans cette expérience que le sens du phénomène et non les valeurs trouvées, car les chiffres obtenus ne supportent aucune comparaison : en effet, la ninhydrine agit beaucoup plus efficacement sur les fractions protéolysées que sur la fraction initiale, la protéolyse ayant augmenté le nombre de groupements aminés (*).

Quoi qu'il en soit, la ninhydrine retarde la floculation dans tous les cas. Le poids moléculaire différent des anticorps de Lapin et de Cheval ne saurait donc expliquer le comportement différent des immunsérums de ces deux animaux vis-à-vis de la ninhydrine.

(*) On trouvera dans la thèse de Buffe [34], la courbe représentative des variations du poids d'azote aminé en fonction de la durée de l'hydrolyse peptasique du sérum normal. Voici quelques chiffres :

Durée de l'hydrolyse	Azote aminé (en g) pour 1 litre de sérum
0	1,09
2 jours	2,12
4 —	2,30
7 —	2,42
15 —	2,42

Ces chiffres montrent que la quantité d'azote aminé n'augmente guère après le septième jour : « l'attaque ne porte que sur une partie de l'azote, malgré cela l'édifice protéique subit d'importantes modifications » [34].

Pope et Healey [211], Northrop [188], Petterman et Pappenheimer [205] ont trouvé que le poids moléculaire de l'antitoxine diphtérique passe de 184.000 à 113.000 ou 90.000, suggérant que la moitié ou le tiers environ de la molécule d'anticorps est scindé par l'enzyme.

III. — POUVOIR ROTATOIRE DES SÉRUMS DE CHEVAL ET DE LAPIN

Nous avons comparé les pouvoirs rotatoires des sérums de Lapin et de Cheval traités par la ninhydrine, ainsi que ceux des fractions protéidiques (euglobulines, pseudoglobulines, albumines) de ces deux espèces.

Après avoir déterminé les doses maxima de ninhydrine à mettre en jeu pour obtenir encore une lecture possible (*), nous avons amené les sérums ou les fractions au même titre en protéines, et nous avons comparé les pouvoirs rotatoires (**) en l'absence et en présence de ninhydrine.

Il n'existe aucune différence notable entre les résultats que nous avons obtenus, chez le Lapin et chez le Cheval, après action de la ninhydrine.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

Dans ce chapitre, nous avons étudié comparativement chez le Lapin et chez le Cheval de nouvelles caractéristiques et propriétés des immunsérums (poids moléculaires des anticorps, pouvoir polarimétrique).

Notre étude ne nous a pas permis d'apporter une explication aux phénomènes immunologiques que nous avons constatés. Il est cependant une dernière propriété que nous n'avons pas encore étudiée et qui va faire l'objet du dernier chapitre de la deuxième partie : c'est l'avidité des immunsérums de Lapin et de Cheval.

(*) Une trop forte dose de ninhydrine colore trop intensément le milieu et ne permet plus la lecture du pouvoir polarimétrique. Les lectures sont possibles lorsque l'on met en jeu des doses de ninhydrine comprises entre 0,05 cm^3 et 0,20 cm^3 d'une solution à 1 p. 100 par cm^3 de sérum.

(**) Nous avons utilisé le polarimètre de grande précision de Jobin et Yvon.

CHAPITRE VII

HYPOTHÈSE METTANT EN JEU L'AVIDITÉ DES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN ET DE CHEVAL TRAITÉS PAR LA NINHYDRINE

Nous avons essayé d'expliquer précédemment les raisons pour lesquelles un immunsérum de Lapin traité par la ninhydrine flocule beaucoup plus rapidement en présence de l'antigène correspondant, l'inverse se produisant pour un immunsérum de Cheval.

Nous avons cru tout d'abord que la localisation différente des anticorps dans le sérum de ces deux espèces allait fournir l'explication recherchée. Il n'en a rien été : la ninhydrine modifie davantage la solubilité des euglobulines que celle des pseudoglobulines, mais les modifications évoluent dans le même sens pour un animal donné, quelle que soit la localisation des anticorps.

Nous avons pensé ensuite que le « blocage » des fonctions amine par la ninhydrine pouvait être très différent suivant que l'on s'adresse au sérum de Lapin ou à celui de Cheval. Or, la ninhydrine agit sur le sérum de ces deux espèces d'une façon tout à fait parallèle.

Nous avons cru encore que la ninhydrine pouvait, dans l'une des espèces, modifier la répartition électrophorétique des protéines et augmenter par exemple les fractions ayant des caractères de β-globulines dont on connaît le rôle dans les réactions de floculation en général. Les essais que nous avons réalisés n'ont pas confirmé non plus notre hypothèse.

Nous avons effectué encore d'autres essais comparatifs, au cours desquels nous avons mis en jeu d'autres propriétés

physicochimiques des protéines. Nous ne rapporterons pas ces essais qui tous ont montré que les immunsérums de Lapin et de Cheval se conduisent d'une façon très parallèle.

La différence d'action exercée par la ninhydrine sur la floculation des immunsérums de Lapin et de Cheval ne semble donc pas explicable par la modification d'une propriété physicochimique.

Nous avons alors pensé que les modifications apportées par la ninhydrine ne pouvaient peut-être apparaître qu'une fois le complexe antigène - anticorps formé. Il nous semblait, en effet, plausible de penser que le complexe antigène - anticorps de Lapin (traité par la ninhydrine) puisse peut-être floculer après avoir atteint une taille inférieure à la taille habituelle, l'inverse se produisant lorsqu'un immunsérum de Cheval est mis en jeu.

Pour vérifier le bien-fondé éventuel de cette hypothèse, il fallait mesurer la taille des complexes antigène - anticorps formés. La diffusion latérale de la lumière nous sembla la méthode de choix pour réaliser notre étude.

Lord Rayleigh a montré, en effet, qu'il existe une relation entre l'intensité de la lumière diffusée et le diamètre, ainsi que le nombre des particules diffusantes [215] (cette relation dépend aussi de la longueur d'onde de la lumière incidente, de l'indice de réfraction du milieu et de la direction d'observation). La formule de Rayleigh ne peut cependant pas s'appliquer aux liquides, car dans ce cas les interférences interparticulaires entrent en jeu. Une autre complication se produit lorsque le diamètre des particules n'est pas négligeable par rapport à la longueur d'onde.

Par la suite, il a été démontré que les constatations de Rayleigh peuvent s'appliquer aux milieux biologiques dans certaines conditions : milieu trouble homogène à particules sphériques d'un diamètre inférieur à 1 μ, entre certaines limites de concentrations [38] (*). Cependant, l'étude de la diffusion de la lumière à 90° ne permet pas d'obtenir des renseignements précis sur les particules diffusantes des milieux biologiques (souvent l'indice de réfraction de ces particules n'est pas constant; de plus, les dimensions de ces dernières varient); il est donc nécessaire d'y ajouter des mesures de polarisation et d'ellipticité. Citons à ce propos les

(*) On trouvera un exposé plus détaillé de cette question dans une récente revue de Canals [38].

travaux de Dognon [55] qui effectue des mesures de diffusion dans un cône de faible ouverture autour des faisceaux transmis; les travaux de Pokrowsky [207] mettant en jeu la connaissance de deux intensités diffusées dans deux directions déterminées, enfin les travaux de Lange [139] sur le facteur de dépolarisation.

Ces diverses études théoriques ont permis d'appliquer la diffusion latérale de la lumière à l'étude des protéines (Putzey, 1934 [213], Doty, 1946 [56], Haurowitz, 1950 [98]). La réaction antigène - anticorps a pu être étudiée également au moyen de la diffusion latérale de la lumière. Les travaux de Boyden [28], Goldberg [84], de Gitlin et Edelhoch [80], de Tayeau et Marquevielle [262] montrent que cette méthode est valable, car il y a une correspondance satisfaisante entre les résultats obtenus et l'azote contenu dans le précipité spécifique.

Nous n'avons pas pu mesurer en valeur absolue la taille des complexes antigène - anticorps formés, car nous ne disposions pas de l'appareil nécessaire, actuellement en fabrication dans le laboratoire où nous travaillons. Nous nous sommes contentée, pour nos essais, du diffuso-absorptiomètre de Dognon, qui ne permet certes pas d'effectuer des mesures absolues, mais qui peut réaliser des études comparatives qui intéressent tout particulièrement nos recherches.

Nos essais ont consisté à placer dans la cuve de l'appareil l'immunsérum de Lapin ou de Cheval traité ou non par la ninhydrine, puis à mettre l'antigène. A partir de ce moment, on effectue des mesures à intervalles de temps réguliers (*), jusqu'à ce que l'on observe la floculation. Il devient ainsi possible de tracer la courbe des variations de la lumière diffusée en fonction du temps. L'examen de ces courbes permet de voir si, dans les différents cas étudiés, la floculation se produit ou non pour une diffusion identique; elle permet encore de calculer le temps mis par le mélange pour atteindre un taux de diffusion déterminé, c'est-à-dire une même taille.

I. — ESSAIS SUR L'IMMUNSÉRUM DE LAPIN

Nous avons utilisé un sérum de Lapin antipseudoglobulines de Cheval.

(*) Lectures en microampères; ces mesures correspondent à l'intensité du courant débité par la cellule de l'appareil (lumière diffusée à 90°).

Nous avons préparé les deux mélanges A et B.

	Mélange A (témoin)	Mélange B
Immunsérum	1 cm³	1 cm³
Sol. de ninhydrine à 1 p. 100..	0 cm³	0,50 cm³
Eau physiologique	7 cm³	6,50 cm³ (*)

Les mesures commencent lorsque l'antigène est ajouté (en agitant) à la solution de l'immunsérum (zone d'équivalence [**]).

Le tableau XXXIX rassemble les résultats que nous avons obtenus :

A ce tableau correspondent les courbes de la figure 22 :

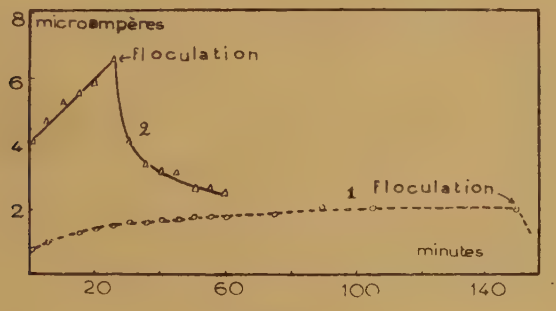


FIG. 22.

Courbes représentatives des variations de la lumière diffusée par le mélange pseudoglobulines de Cheval - antisérum de Lapin, traité (courbe 2) ou non (courbe 1) par la ninhydrine, en fonction du temps (le temps O correspond au moment du mélange antigène - anticorps).

Ces courbes permettent de constater :

1° Qu'après action de la ninhydrine, l'immunsérum met un temps très notablement plus court à atteindre une taille déterminée;

2° Qu'après action de la ninhydrine, la floculation se produit lorsque l'agrégat atteint une taille notablement supé-

(*) La ninhydrine est ajoutée au sérum dilué, puis on place le mélange à l'étuve à 37° C pendant une heure. On remarquera que la dose de ninhydrine mise en jeu est relativement faible. En opérant ainsi, on arrive à obtenir une diffusion identique avec les mélanges A et B.

(**) Dans notre première série d'essais, nous avons mis en jeu 5 cm³ du mélange et 5 cm³ d'une solution de pseudoglobulines de Cheval (à 5 p. 100) diluée au 1/64.

TABLEAU XXXIX

Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé
0	7	27	14	13	54	28	15	55	42	16	31	56	17	26
1	7	37	15	13	55	29	15	48	43	16	32	57	17	25
2	7	41	16	13	55	30	15	40	44	16	31	58	17	25
3	8	43	17	13	56	31	15	38	45	16	32	59	17	25
4	9	45	18	13	56	32	15	37	46	16	31	60	17	25
5	10	47	19	13	57	33	15	34	47	17	30	1 h. 15	19	.....
6	10	48	20	14	58	34	16	32	48	17	27	1 h. 30	21	.....
7	11	50 F	21	14	58	35	16	33	49	17	27	1 h. 45	21	.....
8	11	50 F	22	14	60	36	16	31	50	17	26	2 h.	21	.....
9	11	51	23	14	59	37	16	31	51	17	26	2 h. 15	21	.....
10	12	52	24	14	63	38	16	31	52	17	27	2 h. 30	21 F	.....
11	12	52	25	14	67	39	16	31	53	17	26	2 h. 45	22 F	.....
12	12	53	26	14	62	40	16	31	54	17	26	.....	.....	.....
13	13	53	27	15	62	41	16	32	55	17	26	.....	.....	.....

N. B. — Les chiffres correspondent à l'intensité du courant (en microampères) débité par la cellule du diffuso-absorptiomètre de Dognon. — F : floculation.

rieure à la normale, comme si la ninhydrine avait augmenté la solubilité du complexe antigène - anticorps.

II. — ESSAIS SUR L'IMMUNSÉRUM DE CHEVAL

Nous avons mis en jeu un sérum de Cheval antidiphtérique. Nous avons préparé les deux mélanges A et B.

	Mélange A (témoin)	Mélange B
Immunsérum	1 cm³	1 cm³
Sol. de ninhydrine à 1 p. 100..	0 cm³	0,50 cm³
Eau physiologique	9 cm³	8,50 cm³

(La ninhydrine est placée dans le sérum dilué, puis on place le mélange à l'étuve à 37° C pendant une heure.)

Nos mesures ont été effectuées comme dans l'expérience précédente (*).

Les résultats de cette expérience sont consignés dans le tableau XL.

Une seconde série d'expériences réalisée de la même façon donne les résultats consignés dans le tableau XLI.

A nos résultats correspondent les courbes de la figure 23 :

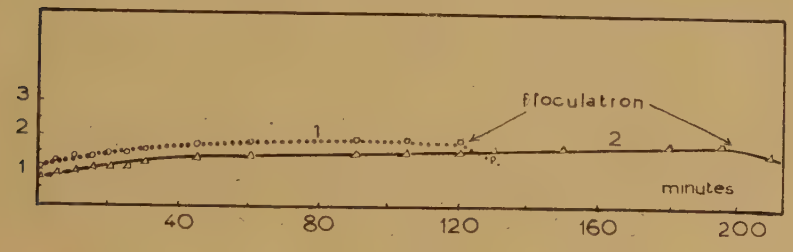


Fig. 23.

Courbes représentatives des variations de la lumière diffusée par le mélange toxine diphtérique - antisérum de Cheval, traité (courbe 2) ou non (courbe 1) par la ninhydrine, en fonction du temps (le temps O correspond au moment du mélange antigène - anticorps).

Ces résultats permettent de constater :

1° Que l'immunsérum de Cheval, traité par la ninhydrine et mis en présence de son antigène, met un temps beaucoup plus long à atteindre une taille déterminée que le même immunsérum non traité;

(*) Dans cet essai, nous avons mis en jeu 5 cm³ du mélange et 7 cm³ de toxine diluée au demi (à 50 unités par cm³).

TABLEAU XI

Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps	Sérum	Sérum ninhydrinisé
0	10	8	8	12	9	16	14	10	24	14	11	1 h.	17	15
1	11	8	9	13	10	17	14	10	25	14	11	1 h. 30	18	15
2	11	8	10	13	10	18	14	11	26	15	11	1 h. 45	18 F	16
3	12	9	11	13	10	19	14	11	27	15	11	2 h.	18 F	16
4	12	9	12	13	10	20	14	11	28	15	11	2 h. 30	15	16
5	12	9	13	13	10	21	14	11	29	15	11	3 h.	.....	17
6	12	9	14	13	10	22	14	11	30	15	11	3 h. 15	.....	17 F
7	12	9	15	13	10	23	14	11	45	17	14	3 h. 30	... ...	15

N. B. — Les chiffres correspondent à l'intensité du courant (en microampères) débité par la cellule du diffuso-absorptiomètre de DOGNON. — F : floculation.

TABLEAU XLI

Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps (minutes)	Sérum	Sérum ninhydrinisé	Temps	Sérum	Sérum ninhydrinisé
0	10	7	10	15	9	20	16	10	30	17	11	3 h.	.....	18 F
1	11	7	11	15	9	21	16	10	45	18	12	3 h. 15	.....	18 F
2	12	7	12	15	9	22	16	11	1 h.	18	13	3 h. 30	.....	17
3	12	8	13	15	9	23	16	11	1 h. 15	19	13	.....	.....	.....
4	13	8	14	15	10	24	16	11	1 h. 30	20	14	.....	.....	.....
5	13	8	15	15	10	25	17	11	1 h. 45	20 F	14	.....	.....	.....
6	14	8	16	16	10	26	17	11	2 h.	.....	15	.....	.....	.....
7	14	8	17	16	10	27	17	11	2 h. 15	.....	16	.....	.....	.....
8	14	9	18	16	10	28	17	11	2 h. 30	.....	17	.....	.....	.....
9	14	9	19	16	10	29	17	11	2 h. 45	.....	18	.....	.....	.....

N. B. — Les chiffres correspondent à l'intensité du courant (en microampères) débité par la cellule du diffuso-absorptiomètre de Dognon. — F : floculation.

2° Avec le sérum traité, la floculation se produit lorsque les agrégats ont atteint une taille un peu inférieure à la taille du sérum témoin, comme si la ninhydrine avait diminué la solubilité du complexe antigène - anticorps.

Cette diminution de solubilité du complexe, dans le cas de l'immunsérum de Cheval, se trouve mise en évidence dans une série d'expériences que nous avions réalisées au début de nos essais, et au cours desquelles nous avions étudié le poids des précipités antigène - anticorps formés en fonction du temps. Nous avions alors constaté que l'immunsérum « ninhydrinisé » donnait naissance à des précipités légèrement moins abondants que ceux produits avec l'immunsérum témoin (voir p. 75).

Ces diverses séries d'observations appellent différentes considérations.

Alors que nos recherches n'avaient pas encore été publiées et que le seul travail concernant l'action de la ninhydrine était celui d'Eggerth [67], Machebœuf [160] avait émis une hypothèse concernant l'action de la ninhydrine sur les anticorps. A la suite du travail d'Eggerth qui avait signalé la propriété de la ninhydrine d'augmenter le titre en anticorps des agglutinines [67] (*), Machebœuf suppose que « la ninhydrine, agissant sur les fonctions chimiques polaires de la protéine anticorps modifie l'affinité de cette dernière pour certains satellites et pour les lipides en particulier, et l'on peut penser, ajoute l'auteur, que l'action favorisante de la ninhydrine sur certains immunsérums est due simplement à l'éloignement des satellites gênants qui rendaient inactives les molécules d'anticorps (ou au moins certaines empreintes spécifiques) ».

Peut-on transposer cette hypothèse de Machebœuf aux immunsérums précipitants de Lapin ? Peut-on penser, par exemple, que la ninhydrine éloignant des satellites de l'anticorps fasse apparaître des motifs spécifiques ou plutôt des portions de motifs jusqu'alors masqués et augmente ainsi l'avidité de la précipitine ?

Nous ne pensons pas qu'il en soit ainsi, car les résultats exposés dans la seconde partie de notre travail mettent en doute cette hypothèse (voir p. 150).

Quoi qu'il en soit, nos essais montrent que, contrairement aux hypothèses primitivement émises, l'action de la ninhy-

(*) Nous pensons, à la suite de nos recherches, que le travail d'Eggerth mériterait d'être repris : nous nous demandons, en effet, si les observations d'Eggerth doivent être interprétées comme une augmentation du titre en anticorps.

drine sur les précipitines ne saurait être expliquée, chez le Lapin tout au moins, par une diminution de solubilité de la protéine anticorps, puisque le complexe antigène - anticorps « ninhydrinisé » est plus soluble que le même complexe dont l'anticorps n'a pas subi l'action de la ninhydrine.

D'ailleurs, les toutes récentes expériences réalisées par Tayeau, Pautrizel et M^lle^ Léglise [269] apportent encore un argument nouveau en faveur du rôle négligeable joué par les modifications de solubilité des protéines anticorps « ninhydrinisées ».

Ces auteurs ont montré qu'un sérum de Lapin hémolytique traité par la ninhydrine hémolyse beaucoup plus rapidement les globules correspondants que le sérum non traité; l'inverse se produit avec un sérum hémolytique de Cheval. Nous retrouvons donc là des constatations tout à fait parallèles à celles que nous avons faites avec les précipitines. Or, dans l'hémolyse, on ne saurait faire appel à des modifications de solubilité !

Concluons donc que la ninhydrine possède la propriété d'augmenter l'avidité des immunsérums de Lapin et de diminuer celle des immunsérums de Cheval.

Comment expliquer ce mécanisme différent ? Il est probable qu'une explication cohérente ne pourra pas être fournie tant que nous ne serons pas mieux renseignés sur la nature du motif spécifique et surtout sur la structure des protéines.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE VII

Une étude mettant en jeu la diffusion latérale de la lumière nous a permis de constater que la ninhydrine augmente l'avidité des anticorps de Lapin, tandis qu'au contraire elle diminue celle des anticorps de Cheval.

Elle montre encore que l'action de la ninhydrine sur les immunsérums ne saurait être expliquée par des modifications de solubilité apportées aux protéines anticorps.

TROISIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES
NINHYDRINE ET SÉRUMS DÉLIPIDÉS

CHAPITRE PREMIER

ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN DÉLIPIDÉS

I. — LIPIDES ET RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE

Le sérum sanguin est un milieu limpide et homogène; il contient cependant une appréciable quantité de lipides, substances insolubles dans l'eau. Ces lipides se trouvent maintenus en phase aqueuse grâce aux liaisons qui les unissent aux protéines, l'ensemble formant des *cénapses lipidoprotéidiques* (Macheboeuf [156]). Lorsque, par les techniques de relargage, on isole du sérum une fraction protéidique, celle-ci entraîne avec elle des lipides. Ces lipides ne sont pas sans apporter des modifications aux propriétés physicochimiques des protéines. Les protéines - anticorps n'échappent pas à cette règle et comportent toujours des lipides (Chow et Goebel [41]).

Le phénomène de précipitation spécifique consistant en l'insolubilisation de complexes antigène - anticorps, on conçoit tout l'intérêt des lipides sériques en immunochimie.

Il est possible de priver un sérum de ses lipides sans dénaturation des protéines : un immunsérum ainsi privé de ses lipides a conservé ses propriétés immunologiques (Hardy et Gardiner [94]). Il n'en est plus de même en ce qui concerne son pouvoir précipitant : Hartley [95], puis plus tard Linderström-Lang et Schmidt [144] ont démontré avec des systèmes variés que, si les propriétés immunologiques ont persisté, il n'en est plus de même du pouvoir floculant qui a disparu.

On s'est demandé si les diverses substances lipidiques que contient le sérum étaient responsables au même titre du phénomène de floculation; Douglas et Dudley [58] avaient insisté en particulier sur la richesse en cholestérol des précipités spécifiques. Mettant en jeu la technique de Tayeau [253], qui permet d'enlever électivement et quantitativement le cholestérol sérique sans dénaturer les protéines, Tayeau et Neuzil [266] ont montré qu'un sérum antidiphtérique privé de son cholestérol a conservé intégralement ses propriétés floculantes. Tayeau, Neuzil et Pautrizel [267] ont étendu ce résultat à divers systèmes immunologiques.

A la suite de ces recherches, il semble qu'il faille attribuer surtout aux phosphatides la propriété de favoriser l'insolubilisation des complexes antigène - anticorps. Signalons à ce propos que les phosphatides seraient également responsables de l'insolubilité dans l'eau de la fraction euglobuline (Tayeau [254]).

Les travaux réalisés par Horsfall et Goodner [118] apportent à cette conception un intéressant argument : ces auteurs ont montré que le sérum antipneumococcique de Cheval ou de Lapin préalablement privé de ses lipides récupère ses propriétés floculantes après avoir été additionné de phosphatides (lécithines dans le cas du Cheval, céphalines dans le cas du Lapin). C'est là, cependant, un cas exceptionnel et d'ailleurs discuté qui ne saurait être étendu à tous les systèmes : Pautrizel [201], par exemple, n'est jamais parvenu à rendre les propriétés floculantes à un sérum antidiphtérique délipidé, même en fixant des lécithines sur les protéines (technique de Hofer [112]). Peut-être la nature des liaisons phosphatides-protéines joue-t-elle le rôle essentiel [201] ?

Quoi qu'il en soit, on peut concevoir aisément l'importance des lipides dans la précipitation spécifique.

Selon les travaux réalisés par certains auteurs, le rôle éventuel des lipides dans le mécanisme de la réaction de précipitation spécifique devrait être révisé : travaillant sur le système pseudoglobulines de Porc - antisérum de Cheval, Delsal, Pérez et Laporte [52] ont noté que la délipidation de l'immunsérum à l'aide d'éther légèrement alcoolisé (3 p. 100) et à une température de — 70° C ne prive pas du tout le sérum de ses propriétés floculantes; pourtant, la délipidation effectuée par cette technique se montre plus efficace que celle réalisée selon Hardy et Gardiner [94]. Ces auteurs concluent que cette dernière méthode de délipidation provoque une dénatu-

ration des anticorps entraînant la perte des propriétés précipitantes. Nous montrerons plus loin l'inexactitude de cette conception. Une autre hypothèse émise par les mêmes auteurs nous semble préférable [52] : ces derniers pensent que l'alcool absolu, utilisé dans la technique de HARDY et GARDINER, déshydrate les molécules de protéines et modifie ainsi l'arrangement moléculaire; il n'en serait pas de même avec l'éther légèrement alcoolisé dont l'action se montrerait moins énergique et pourtant plus efficace.

KRUEGER et HEIDELBERGER [131] estiment, de leur côté, que les lipides ne sont pas indispensables à la floculation et qu'il suffit de soumettre à la centrifugation un mélange d'antigène et d'anticorps correspondant délipidé pour voir apparaître la précipitation spécifique; TAYEAU et MARQUEVIELLE n'ont pas pu confirmer ces résultats (*).

Le rôle des lipides dans la précipitation spécifique laisse encore place à certains doutes, et de nombreux auteurs, parmi lesquels DELSAL, PÉREZ et LAPORTE [52] pensent que la technique de délipidation de HARDY et GARDINER n'est pas sans altérer quelque peu le motif de l'anticorps qui, s'il conserve ses propriétés anticorps, n'en a pas moins perdu ses propriétés floculantes.

Notre étude concernant l'action de la ninhydrine sur les immunsérums délipidés de Lapin va venir infirmer cette conception.

II. — NINHYDRINE ET IMMUNSÉRUMS DE LAPIN DÉLIPIDÉS

Le point de départ des expériences que nous avons réalisées et qui remontent à plus de trois ans (**) fut une hypothèse qui, par la suite, se révéla inexacte, mais qui nous conduisit néanmoins au phénomène faisant l'objet de ce chapitre.

Nous nous étions demandée, en effet, s'il n'était pas possible de restituer à un sérum délipidé ses propriétés floculantes en le traitant par un réactif chimique qui, tout en respectant le motif spécifique des anticorps, modifierait légèrement leur solubilité : la ninhydrine, à la suite de la lecture des travaux

(*) Résultats non publiés.

(**) Une note [258] et un mémoire [260] ont déjà été publiés sur ces expériences.

de Dulière et d'Eggerth, nous parut répondre à ces deux conditions.

Notre première série d'essais a porté sur le système sérum de Cheval - antisérum de Lapin. Après avoir déterminé la zone des proportions optima, nous avons délipidé les sérums antigène et anticorps par la méthode de Hardy et Gardiner [94] (*).

Après avoir vérifié que cette opération avait fait disparaître le phénomène de floculation, nous avons traité le sérum anticorps délipidé par la ninhydrine et nous l'avons placé en présence de son antigène (zone des proportions optima). Le tableau XLII réunit nos résultats :

TABLEAU XLII

Sérums utilisés	Temps de floculation
Sérum de Lapin - sérum de Cheval (témoin).	120 minutes
Sérum de Lapin traité par la ninhydrine (**) - sérum de Cheval.	20 minutes
Sérum de Lapin délipidé - sérum de Cheval.	Pas de floculation
Sérum de Lapin délipidé traité par la ninhydrine (**) - sérum de Cheval.	25 minutes

N. B. — Nos immunsérums de Lapin ont été dilués au 1/8 et floculent dans la zone des proportions optima avec le sérum de Cheval dilué au 1/64.

Ces résultats, qui rappellent le pouvoir accélérant exercé par la ninhydrine sur la floculation des immunsérums de Lapin, montrent que ce réactif, agissant à la concentration de 0,1 p. 100 pendant une demi-heure à 37° C, possède la propriété de restituer à un immunsérum préalablement délipidé son pouvoir floculant.

Afin de vérifier que la précipitation observée correspondait bien à un phénomène spécifique, nous avons effectué de nouvelles expériences dans lesquelles nous avons mis en

(*) On trouvera des détails sur cette technique et sur ses perfectionnements (Hewitt) dans la thèse de Neuzil [183].

(**) 0,1 p. 100 pendant une demi-heure à 37° C,

contact du sérum de Lapin anti-Cheval délipidé traité par la ninhydrine et de l'eau physiologique (à la place du sérum antigène) ; nous avons alors placé le mélange au bain-marie à 37° C; vingt-quatre heures plus tard, aucune floculation ni même aucun trouble ne s'étaient produits.

Dans un autre essai, nous avons mis en contact des doses variées de sérum de Lapin non immun traité par la ninhydrine et du sérum de Cheval. Nous avons placé les mélanges au bain-marie à 37° C. Aucun précipité n'était apparu cette fois encore après vingt-quatre heures. Le phénomène que nous avons observé est donc un phénomène bien spécifique.

Une dernière question doit encore être posée : le traitement de l'immunsérum par la ninhydrine a-t-il modifié le titre en anticorps ?

Nous avons tout d'abord réalisé divers mélanges de sérum de Cheval et de sérum de Lapin anti-Cheval, selon la méthode de Dean et Webb, afin de préciser le titre en anticorps de l'immunsérum. Voici les mélanges effectués :

Quatre tubes reçoivent tous 1 cm^3 d'immunsérum de Lapin au 1/16 et 1 cm^3 de sérum de Cheval au 1/16 (tube n° 1), au 1/32 (n° 2), au 1/64 (n° 3), au 1/128 (n° 4). Le mélange comportant le sérum de Cheval au 1/64 floculе en premier (en deux heures). Une série identique dans laquelle l'immunsérum de Lapin a subi la délipidation ne présente aucun trouble après vingt-quatre heures. Enfin, dans une troisième série, l'immunsérum de Lapin a été délipidé, puis traité par la ninhydrine. Dans cette série, c'est encore le mélange comportant le sérum de Cheval au 1/64 qui floculе le premier (en vingt-cinq minutes). Nous pouvons conclure de cette dernière expérience que le traitement de l'immunsérum par la ninhydrine n'a nullement modifié le titre en anticorps.

Pour entraîner définitivement la conviction, il est indispensable de reprendre l'expérience fondamentale non plus avec un antigène hétérogène comme le sérum de Cheval, mais avec des antigènes plus purs.

III. — GÉNÉRALISATION DU PHÉNOMÈNE A DIVERS IMMUNSÉRUMS DE LAPIN

Nous avons immunisé divers Lapins avec des antigènes variés. Les immunsérums délipidés ont été traités par la ninhydrine dans les conditions précédemment exposées. Les

titrations ont été effectuées par la méthode de Dean et Webb, sauf dans le cas de la toxine diphtérique pour laquelle la technique de Ramon a été utilisée. Le tableau XLIII réunit un certain nombre de nos résultats. Il montre la généralité du phénomène.

TABLEAU XLIII

		TEMPS DE FLOCULATION			
Antigène mis en jeu	Dose de ninhydrine éventuellement utilisée (*)	Antigène anticorps sans ninhydrine (Témoin)	Antigène anticorps traité par la ninhydrine	Antigène anticorps délipidé sans ninhydrine	Antigène anticorps délipidé traité par la ninhydrine
Sérum de Cheval	0,4 cm^3 pour 2 cm^3 de sérum dilué au 1/2	2 heures	20 minutes	néant	25 minutes
Toxine diphtérique	0,4 cm^3 pour 2 cm^3 de sérum dilué au 1/2	2 heures	25 minutes	néant	10 heures
Pseudo-globulines de Mouton	0,4 cm^3 pour 2 cm^3 de sérum dilué au 1/2	10 minutes	3 minutes	néant	14 minutes
Albumines de Cheval	0,3 cm^3 pour 2 cm^3 de sérum dilué au 1/2	8 minutes	1 minute	50 minutes	5 minutes
Ovalbumines	0,2 cm^3 pour 2 cm^3 de sérum dilué au 1/2	1 heure	30 minutes	5 heures	2 heures

L'examen du tableau montre encore que certains immunsérums délipidés n'ont pas totalement perdu leur pouvoir floculant : c'est le cas en particulier pour le sérum de Lapin antiovalbumines et pour le sérum de Lapin antialbumines de Cheval. Cette constatation n'est pas un effet du hasard, car le phénomène se renouvelle chaque fois; d'autre part, nous avons vérifié, par des dosages de cholestérol et de phosphatides, l'efficacité de la méthode de délipidation. Remarquons

(*) Solution de ninhydrine à 1 p. 100 dans l'eau physiologique.

néanmoins que la délipidation a considérablement retardé le temps de floculation et que le traitement par la ninhydrine ramène cette floculation à un temps très voisin du sérum non délipidé traité par ce réactif.

Quoi qu'il en soit, nous pouvons certifier que la technique de Hardy et Gardiner [94]; ou bien celle de Saïas [230], utilisées pour la délipidation des immunsérums, ne détruit aucun motif immunologique, puisqu'un réactif chimique, comme la ninhydrine, permet au sérum délipidé de récupérer ses propriétés floculantes sans perdre ni sa spécificité, ni son titre en anticorps.

A notre connaissance, aucun réactif défini n'avait permis jusqu'alors de restituer à un sérum délipidé son pouvoir floculant : la ninhydrine permet cette opération.

Depuis la parution de nos premiers travaux en 1949 [257, 258, 259, 260], un autre réactif, dont l'action sur les protéines se montre d'ailleurs très proche de celle de la ninhydrine, a été reconnu posséder la même propriété : c'est l'α-naphtoquinone-4-sulfonate de sodium (Tayeau et Neuzil [266]). Au contraire, d'autres réactifs, dont l'action sur les protides est habituellement considérée comme parallèle à celle de la ninhydrine, se montrent sans action; c'est le cas pour l'alloxanne, le diacétyle et l'isatine [266].

CONCLUSIONS DU CHAPITRE PREMIER

La ninhydrine permet à un immunsérum délipidé de Lapin de récupérer ses propriétés floculantes, sans que soient modifiés ni la spécificité, ni le titre en anticorps.

Ce résultat est-il susceptible d'être appliqué à d'autres espèces animales ?

Le chapitre II rassemble les essais que nous avons effectués avec le sérum de Cheval.

CHAPITRE II

ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS DE CHEVAL DÉLIPIDÉS

Après avoir constaté que la ninhydrine permet à un immunsérum précipitant de Lapin délipidé de récupérer ses propriétés floculantes, nous avons cherché à étendre nos résultats aux immunsérums de Cheval.

Notre première expérience a porté sur le système toxine diphtérique - sérum antidiphtérique de Cheval. Nous avons tout d'abord précisé, grâce à la technique de Ramon, le titre de l'immunsérum mis en jeu. Ce titre est de 210 unités par cm^3, et le temps de primofloculation est de quatre heures cinquante. Après traitement de l'immunsérum par la ninhydrine (*), la floculation se produit en cinq heures sept minutes. Si nous mettons en jeu l'immunsérum préalablement délipidé, la floculation n'apparaît plus, mais elle n'apparaît pas davantage lorsque le sérum délipidé a été traité par la ninhydrine (pas de floculation après vingt-quatre heures).

Les résultats que nous avons obtenus avec le sérum de Lapin ne sauraient donc être étendus au sérum de Cheval.

Signalons que nous avons effectué diverses gammes de mélanges antigène et anticorps et que, dans aucun cas, nous n'avons obtenu de floculation lorsque l'immunsérum délipidé avait été traité par la ninhydrine.

Nous avons désiré, ici également, étendre nos résultats à divers systèmes immunologiques, et mettant toujours en jeu les immunsérums de Cheval, nous avons étudié divers antigènes.

(*) 0,40 cm^3 de solution à 1 p. 100 par cm^3 de sérum.

Le tableau XLIV réunit nos résultats.

TABLEAU XLIV

Antigènes	Temps de floculation			
	Antigène anticorps (Témoin)	Antigène anticorps (*) ninhydrinisé	Antigène anticorps délipidé	Antigène anticorps délipidé traité par la ninhydrine (*)
Anatoxine diphtérique	5 h. 30	5 h. 67	rien après 24 h.	rien après 24 h.
Toxine diphtérique	37 min.	7 h.	—	—
Anatoxine tétanique	2 h. 15	4 h. 45	—	—
Anatoxine botulique	17 h.	20 h.	—	—
Toxine pesteuse	12 h.	rien après 24 h.	—	—

Ces divers résultats généralisent celui précédemment obtenu.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

La ninhydrine ne permet pas à un immunsérum de Cheval délipidé de récupérer ses propriétés floculantes. Les résultats que nous avons obtenus avec les immunsérums de Lapin ne sauraient donc pas être étendus aux sérums de Cheval.

(*) La dose de ninhydrine a été la suivante : 0,4 cm³ de solution à 1 p. 100 pour 2 cm³ de sérum dilué au demi.

CHAPITRE III

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Dans les deux précédents chapitres, nous avons exposé les résultats que nous avons obtenus en traitant des immunsérums précipitants délipidés de Lapin et de Cheval par la ninhydrine.

Nous avons montré que ce réactif permet à un sérum précipitant de Lapin de récupérer ses propriétés floculantes, préalablement perdues par la délipidation. Au contraire, la ninhydrine ne permet pas à un immunsérum de Cheval délipidé de récupérer ses propriétés floculantes. Comment expliquer cette différence d'action de la ninhydrine sur les immunsérums précipitants de Lapin et de Cheval ?

Quelle différence y a-t-il entre les anticorps de Lapin et ceux de Cheval ? Nous avons déjà eu l'occasion de signaler précédemment (voir pages 111, 116, 114) que les anticorps du Lapin se situent plutôt dans la fraction euglobulinique, tandis que ceux du Cheval, principalement ceux que nous avons utilisés dans nos essais, se trouvent plutôt localisés dans la fraction pseudoglobulinique.

Peut-être cette différence de localisation allait-elle nous permettre d'expliquer le phénomène constaté ?

Pour résoudre ce problème, il convenait d'étudier l'action de la ninhydrine sur la solubilité des fractions euglobulines et pseudoglobulines préalablement délipidées chez le Lapin et chez le Cheval.

Les sérums de Lapin et de Cheval ont été amenés au même titre en protéines. Ils ont été ensuite divisés en deux parties, dont l'une d'elles était alors délipidée par la technique de

Hardy et Gardiner. Chacune de ces deux parts était ensuite divisée en deux nouvelles parties : l'une était traitée par la ninhydrine dans les conditions habituelles, l'autre servait de témoin.

Finalement, nous disposions pour chaque sérum, de Lapin et de Cheval, de quatre préparations présentant le même titre en protéines.

1° Sérum normal,

2° Sérum normal traité par la ninhydrine,

3° Sérum délipidé,

4° Sérum délipidé traité par la ninhydrine.

Dans chaque préparation, nous avons extrait la fraction correspondant aux « euglobulines », c'est-à-dire celle précipitant au tiers de saturation en sulfate d'ammonium (Porges, Fuld et Spiro [212, 17]) et la fraction globulines totales, c'est-à-dire celle précipitant à la demi-saturation en sulfate d'ammonium (Hofmeister [113]) (*).

Dans chacune des deux fractions ainsi obtenues, nous avons dosé les protéines [162]. Le tableau XLV rapporte nos résultats.

Il ressort de ce tableau que la ninhydrine semble dimi-

TABLEAU XLV

Sérums traités (**)	LAPIN			CHEVAL		
	Saturation en sulfate d'ammonium			Saturation en sulfate d'ammonium		
	0,33	0,50	0,50-0,33	0,33	0,50	0,50-0,33
Sérum normal	5,7	17,5	11,8	19,3	52,7	33,4
Sérum traité par la ninhydrine	11,0	20,0	9,0	36,3	61,0	24,7
Sérum délipidé.....	8,1	24,0	15,9	29,5	57,0	27,5
Sérum délipidé traité par la ninhydrine .	18,3	28,3	10,0	47,3	65,9	18,6

(*) La différence trouvée entre les deux chiffres correspond au taux de pseudoglobulines.

On ne donnera à tous ces chiffres qu'une valeur très relative, les techniques de séparation mises en jeu ayant simplement la valeur de tests (Tayeau et Martin [264]).

(**) Les résultats ci-dessus correspondent à 1 cm³ de sérum traité. Le titre des sérums était de 81 g par litre. Les chiffres représentent des mg.

nuer la solubilité des euglobulines délipidées, alors qu'elle augmente au contraire la solubilité des pseudoglobulines délipidées, et cela aussi bien chez le Lapin que chez le Cheval.

Ces résultats viennent confirmer les faits que nous avions précédemment établis. Ils montrent que les anticorps (globuliniques) du Lapin, privés de lipides, voient leur solubilité diminuée sous l'influence de la ninhydrine, et que les anticorps (pseudoglobuliniques de Cheval) délipidés deviennent au contraire plus solubles après traitement par la ninhydrine. On comprendrait ainsi la différence d'action exercée par ce réactif sur les deux sérums. Malgré son caractère apparemment séduisant, cette hypothèse ne saurait être maintenue, pour les mêmes raisons que celles exposées dans la première partie de notre travail (voir p. 118). Les anticorps de Mulet antipolyholoside du charbon, pourtant euglobuliniques, ne récupèrent pas leurs propriétés floculantes lorsqu'ils ont été privés de lipides puis traités par la ninhydrine.

Enfin, les anticorps délipidés, qui en général ne floculent plus, sont moins solubles (voir tableau XLV) qu'avant délipidation. La notion de solubilité ne suffit donc pas à expliquer les phénomènes que nous avons décrits.

Cette différence d'action exercée par la ninhydrine doit être rattachée à l'action de ce réactif sur l'avidité du sérum (voir p. 143) : tandis que la ninhydrine augmente l'avidité des immunsérums de Lapin délipidés, elle diminue au contraire celle des immunsérums de Cheval délipidés.

Ces constatations nous permettent de penser que, probablement, la délipidation d'un immunsérum retarde simplement la floculation; parfois, ce retard est grand et ne peut pas être mesuré, la dénaturation possible des protéines (au bain-marie à 37° C) venant interférer avec la floculation. Dans d'autres cas, ce retard est mesurable (sérum de Lapin antiovalbumines ou antialbumines de Cheval), car la floculation retardée apparaît, alors que la dénaturation des protéines suivie de la précipitation ne s'est pas encore produite.

Une deuxième question se pose alors, la même d'ailleurs que précédemment : pourquoi la ninhydrine augmente-t-elle l'avidité des immunsérums de Lapin et diminue-t-elle, au contraire, l'avidité des immunsérums de Cheval ?

Seule une meilleure connaissance de la structure des protéines dans l'échelle animale pourra nous renseigner. Mais c'est là un problème qui préoccupe tous les biochimistes et qui dépasse le cadre de nos recherches.

CONCLUSIONS DU CHAPITRE III

Nous avons discuté dans ce chapitre les résultats obtenus précédemment. Nous avons montré que la différence d'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums délipidés de Lapin et de Cheval n'est pas due à des modifications de solubilité.

Cette différence doit être rattachée aux modifications apportées par la ninhydrine à l'avidité des immunsérums délipidés de Cheval et de Lapin.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Lorsque l'on mélange en quantités convenables un antigène et le sérum précipitant correspondant, il apparaît, après un certain temps, un louche puis un précipité. Ce phénomène, dont l'étude détaillée représente la première partie de notre travail, est dû à la combinaison des *groupements déterminants* de l'antigène avec les *motifs spécifiques de l'anticorps*.

La nature de ces groupements spécifiques reste encore inconnue, et nous ne possédons que de vagues notions sur le mode de liaison entre l'antigène et l'anticorps. Selon certains, ces liaisons seraient électrovalentielles; selon d'autres, il s'agirait de liaisons hydrogènes ou d'une union par forces de Van der Waals. Un certain nombre de recherches ont déjà été effectuées dans le but de préciser ce mode de liaison. Parmi ces recherches, il convient de mentionner celles mettant en jeu des réactifs bloquant les divers groupements chimiques des protéines; c'est ainsi qu'ont été étudiés le formol, le cétène, le monobromacétate, etc. Tous les réactifs étudiés jusqu'ici retardent ou, à plus forte concentration, inhibent la précipitation spécifique.

Toute étude consistant à étudier parallèlement les modifications chimiques et immunologiques des protéines anticorps est susceptible de nous éclairer sur le mécanisme de la réaction antigène - anticorps. C'est dans ce but que nous avons mis en jeu la ninhydrine.

Nous avons montré que si l'on fait agir cette substance sur un immunsérum précipitant de Lapin (à la concentration de 1 p. 1.000 à 37° C et pendant une demi-heure), le temps de floculation se trouve considérablement réduit lorsque cet immunsérum est mis en présence de son antigène. Pour la première fois, à notre connaissance, un réactif bien défini permet d'accélérer la précipitation spécifique. Nous avons noté que le sérum traité conserve sa spécificité et que son titre en anticorps ne subit aucun changement. Nous avons montré

encore que cette constatation devait être exclusivement rattachée à l'action exercée par la ninhydrine sur l'anticorps.

Nous avons étudié les modalités (rôle de la concentration du réactif, de la durée de son action, de la dilution du milieu, etc.) et, mettant en jeu des antigènes variés, nous avons démontré la généralité du phénomène.

Un immunsérum de Cheval se conduit d'une façon toute différente : la ninhydrine amène dans ce cas un retard de la floculation. Ici encore, nous avons précisé les modalités et la généralité du phénomène.

Nous avons ensuite cherché à expliquer cette différence de comportement vis-à-vis de la ninhydrine des immunsérums de Lapin et de Cheval. Au début, nous avons pensé que cette différence était liée à la localisation des anticorps (euglobulines chez le Lapin, pseudoglobulines chez le Cheval), d'autant plus que la ninhydrine, nous l'avons montré, augmente la solubilité des pseudoglobulines, tandis qu'elle diminue, au contraire, celle des euglobulines.

Une étude détaillée, mettant en jeu diverses fractions protéidiques contenant des anticorps et des immunsérums de Mulet, nous a démontré l'inexactitude de notre hypothèse : un sérum de Mulet antipolyholoside du charbon, par exemple, dont les anticorps sont pourtant euglobuliniques, se conduit vis-à-vis de la ninhydrine comme un immunsérum de Cheval.

Nous avons étudié en détail les modifications apportées par la ninhydrine aux sérums de Lapin et de Cheval, espérant ainsi trouver entre ces deux espèces une différence de comportement. C'est ainsi que nous avons envisagé le blocage des groupements aminés, le pouvoir polarimétrique, la résistance à l'hydrolyse des protéines traitées, etc. Dans tous les cas, le sérum de Lapin et celui du Cheval se sont comportés d'une façon comparable.

Nous avons alors suivi l'évolution de la réaction de précipitation antigène - anticorps ninhydrinisé ou non, chez le Lapin et chez le Cheval, par la diffusion latérale de la lumière. Cette étude nous a permis de conclure que la différence de comportement des immunsérums de Lapin et de Cheval devait être rattachée à une modification de l'avidité, due à l'action de la ninhydrine : ce réactif augmente en effet l'avidité des anticorps du Lapin, tandis qu'il diminue, au contraire, celle des anticorps du Cheval.

Dans une dernière partie, nous avons envisagé l'action exercée par la ninhydrine sur les immunsérums délipidés. On sait

que la plupart des immunsérums perdent leur pouvoir précipitant par délipidation. Certains auteurs ont même incriminé l'agressivité des techniques de délipidation provoquant, selon eux, une dénaturation partielle de la protéine - anticorps.

Nous avons infirmé cette conception en montrant qu'un immunsérum de Lapin délipidé récupère ses propriétés floculantes sous l'action de la ninhydrine, sans que sa spécificité et son titre en anticorps aient été modifiés. Après avoir noté qu'un sérum délipidé de Cheval ne se conduit pas de la même façon, nous discutons le mécanisme d'action de la ninhydrine.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abderhalden (E.). — *Fermentfors.*, 1940, **16,** 297.
2. Abderhalden (R.). — *Z. physiol. Chem.*, 1938, **252,** 81.
3. Abderhalden (E.) & Schmidt (H.). — *Z. physiol. Chem.*, 1911, **72,** 37.
4. Abderhalden (E.) & Schmidt (H.). — *Z. physiol. Chem.*, 1913, **85,** 143.
5. Anderson (T. E.) & Stanley (W. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **39,** 339.
6. Arrhenius (S.). — Immunochemistry, 1 vol., Mac. Millan & C^ie^, édit., New-York, 1907.
7. Arrhenius (S.) & Madsen (T.). — *Z. physik. Chem.*, 1903, **44,** 6.
8. Ascoli (M.) & Valenti (E.). — *Z. Hyg. Infectionkr.*, 1910, **7,** 5.
9. Avery (O. T.) & Goebel (W. F.). — *J. Exptl. Med.*, 1933, **58,** 731.
10. Baddar (F. G.). — *J. Chem. Soc.*, 1949 (suppl. Issue n° 1), s. 163.
11. Banks (T. E.), Francis (G. E.), Mulligan (W.) & Wormall (A.). — 1^st^ Congress Biochem., Cambridge, 1949, p. 476.
12. Banks (T. E.), Francis (G. E.), Mulligan (W.) & Wormall (A.). — *Nature*, 1950, **165,** 111.
13. Banks (T. E.), Francis (G. E.), Mulligan (W.) & Wormall (A.). — *Biochem. J.*, 1951, **48,** 180 et 371.
14. Bayne-Jones (S.). — *J. Immunol.*, 1925, **10,** 663.
15. Bertrand (J.). — Thèse Univ. (Pharm.), Lille, 1938.
16. Bjorneboe (M.), Gormsen (M.) & Lundquist (F.). — *J. Immunol.*, 1947, **55,** 121.
17. Boivin (A.), Mesrobeanu (I.) & Mesrobeanu (L.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1933, **114,** 307.
18. Bordet (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13,** 225 et 273.
19. Bordet (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1900, **14,** 257.
20. Bordet (J.). — Traité de l'immunité et des maladies infectieuses, 1 vol., Masson & C^ie^, édit., Paris, 1939.
21. Boyd (W. C.). — *J. Exptl. Med.*, 1941, **74,** 369.
22. Boyd (W. C.). — *J. Exptl. Med.*, 1946, **83,** 221 et 83.

23. Boyd (W. C.). — *Ann. N.-Y. Acad. Sc.*, 1946, **46,** 927.
24. Boyd (W. C.). — Fundamentals of immunology, second edition, Interscience Publishers, New-York, 1947, p. 216, fig. 26.
25. Boyd (W. C.), Conn (J. B.), Gregg (D. C.), Kistiakowsky (G. B.) & Roberts (R. M.). — *Science*, 1940, **92,** 604.
26. Boyd (W. C.) & Hooker (S. B.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1938, **39,** 491.
27. Boyd (W. C.) & Purnell (M. A.). — *J. Exptl. Med.*, 1944, **80,** 289.
28. Boyden (A.), Bolton (E.) & Gemeray (D.). — *J. Immunol.*, 1947, **57,** 211.
29. Breton (J.). — *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1947, **85,** 12.
30. Bricas (E.) & Macheboeuf (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141,** 1120.
31. Brown (A. M.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1935, **16,** 554.
32. Brown (A. M.). — Voir Boyd (W. C.) [24].
33. Bruckmann (G.) & Wertheimer (E.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **168,** 241.
34. Buffe (G. M.). — Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1946, p. 43.
35. Burchardt (H.). — *Jahresber. Forschr. Thier-Chem.*, 1889, **19,** 85.
36. Burnet (F. M.). — *J. Path. Bact.*, 1931, **34,** 471.
37. Butler & Randall. — Progress in biophysics and biophysical chemistry, London, Butterworth, Springer, L. T. D., 1950, p. 73.
38. Canals (E.). — *Tunisie Médicale*, 1951, **29,** 859.
39. Chargaff (E.) & Bendich (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1943, **149,** 93.
40. Chargaff (E.) & Ziff (H.). — *J. Biol. Chem.*, 1941, **138,** 787.
40bis. Cherbuliez (E.) & Herzenstein (A.). — *Helv. Chim. Acta*, 1934, **17,** 1410.
41. Chow (B. F.) & Goebel (W. F.). — *J. Exptl. Med.*, 1935, **62,** 179.
42. Cohn (E. J.). — U. S. Patent, 2.390 (4-12-45), 740.
43. Cohn (M.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130,** 346.
44. Colwell (C. A.) & Youmans (G. P.). — *J. Immunol.*, 1941, **42,** 79.
45. Copley (G. N.). — *Analyst*, 1941, **66,** 492.
46. Coppo (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118,** 1307, et **119,** 175.
47. Danielli (J. F.), Danielli (M.) & Marrack (J. R.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1938, **19,** 393.
48. Danysz (J.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1902, **16,** 331.

49. Dean (H. R.) & Webb (R. A.). — *J. Path. Bact.*, 1926, **29**, 473.
50. Deicha (G.). — *Nature*, 1938, **143**, 279.
51. Delaunay (D.), Lebrun (J.) & Delaunay (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1948, **226**, 133.
52. Delsal (J. L.), Pérez (J.) & Laporte (R.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1950, **52**, 219.
53. Denigès (G.). — *Bull. Trav. Soc. Pharm. Bordeaux*, 1914, **54**, 49.
54. Dervichian (D.) & Grabar (P.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1942, **214**, 195.
55. Dognon (A.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1942, **24**, 205; 1943, **25**, 13, et 1949, **31**, 666.
56. Doty (P. M.), Affens (W.) & Zimm (B. H.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1946, 42 B, 66.
57. Dougherty (T. E.), White (A.) & Chase (J. H.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1944, **56**, 28, et 1945, **58**, 135.
58. Douglas (S. R.) & Dudley (H. W.). — Voir Hartley (P.) [95].
59. Downs (C. M.) & Goodner (K.). — *J. Inf. Dis.*, 1926, **38**, 240.
60. Dulière (W. C.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 770.
61. Dulière (W. C.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **127**, 1122.
62. Duncan (J. T.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1932, **13**, 489.
63. Duncan (J. T.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1934, **15**, 23.
64. Dungern (F. von). — In Festschrift zum sechzigsten geburstage van Robert Koch, 1 vol., Fischer, édit., 1903.
65. Eagle (H.). — *J. Immunol.*, 1932, **23**, 153.
66. Eaton (M. D.). — *J. Bact.*, 1936, **31**, 367.
67. Eggerth (A. H.). — *J. Immunol.*, 1941, **42**, 199, et 1942, **45**, 303.
68. Ehrich (W. E.) & Harris (T. N.). — *Science*, 1945, **101**, 28.
69. Ehrlich (P.). — Studies on immunity, 1 vol., John Wiley and Sons, édit., New-York, 1906.
70. Eisen (H. N.) & Karush (F.). — *J. Allergy*, 1949, **20**, 393.
71. Erlenmeyer (H.) & Berger (E.). — *Biochem. Z.*, 1932, **252**, 22.
72. Faure (M.). — Thèse Sc., Paris, 1940.
73. Fagraeus (A. K.). — *Nature*, 1947, **159**, 499.
74. Falco (R. J. de). — *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, 1941, **46**, 500.
75. Felton (L. D.). — *J. Immunol.*, 1932, **22**, 453.
76. Ferguson (J. H.) & Ralph (P. H.). — *Am. J. Physiol.*, 1943, **138**, 648.
77. Follensby (E. M.) & Hooker (S. B.). — *J. Immunol.*, 1936, **31**, 141.
78. Fuld (E.) & Spiro (K.). — *Z. physiol. Chem.*, 1900, **31**, 132.
79. Gilmous (D.) & Calaby (J. H.). — *Australian J. Scient. Res.*, série B, 1949, **2**, 216.
80. Gitlin (D.) & Edelhoch (M.). — *J. Immunol.*, 1951, **66**, 67.

81. Glenny (A. T.) & Barr (M.). — *J. Path. Bact.*, 1932, **35**, 91.
82. Glenny (A. T.), Pope (C. G.) & Waddington (M.). — *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 279.
83. Goebel (W. F.) & Hotchkiss (R. D.). — *J. Exptl. Med.*, 1937, **66**, 191.
84. Goldberg (R. J.) & Campbell (D. H.). — *J. Immunol.*, 1951, **66**, 79.
85. Goldie (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **118**, 220 et 1041.
86. Goldie (H.) & Sandor (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **128**, 974.
87. Goodner (K.), Horsfall (F. L. Jr.) & Bauer (J. M.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1936, **34**, 617.
88. Grabar (P.). — Les globulines du sérum sanguin, 1 vol., Desoer et Masson, édit., Liège, Paris, 1947.
89. Grabar (P.) & Staub (A. M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1942, **68**, 355.
90. Grassman (W.) & Arnim (K. V.). — *Ann. Chem.*, 1934, **509**, 288.
91. Grassman (W.) & Arnim (K. V.). — *Ann. Chem.*, 1935, **519**, 192.
92. Griffith (M.). — *Arch. Biochem.*, 1949, **20**, 451.
93. Harding (V. J.) & Mac Lean (R. M.). — *J. Biol. Chem.*, 1915, **20**, 217, et 1916, **24**, 503.
94. Hardy (W. B.) & Gardiner (S.). — *J. Physiol.*, 1910, **40**, LXVIII.
95. Hartley (P.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1925, **6**, 180.
96. Haurowitz (F.), Crampton (C. F.) & Sowinski (R.). — *Fed. Proc.*, 1951, **10**, 560.
97. Haurowitz (F.). — *J. Immunol.*, 1942, **43**, 331.
98. Haurowitz (F.). — Chemistry and biology of proteins, 1 vol., Academic Press, New-York, 1950.
99. Haurowitz (F.) & Etili (L.). — *Fed. Proc.*, 1948, **8**, 404.
100. Haurowitz (F.) & Schwerin (P.). — *J. Immunol.*, 1943, **47**, 111.
101. Heidelberger (M.). — *J. Exptl. Med.*, 1937, **66**, 229.
102. Heidelberger (M.). — *Bact. Rev.*, 1939, **3**, 49.
103. Heidelberger (M.) & Avery (O. T.). — *J. Exptl. Med.*, 1923, **38**, 73, et 1924, **40**, 301.
104. Heidelberger (M.) & Kendall (F. E.). — *J. Exptl. Med.*, 1931, **53**, 625.
105. Heidelberger (M.) & Kendall (F. E.). — *J. Exptl. Med.*, 1935, **62**, 697.
106. Heidelberger (M.) & Kendall (F. E.). — *J. Exptl. Med.*, 1935, **61**, 563.
107. Heidelberger (M.), Kendall (F. E.) & Sherp (H. W.). — *J. Exptl. Med.*, 1936, **64**, 559.

108. Heidelberger (M.), Kendall (F. E.) & Soo-Moo (C. M.). — *J. Exptl. Med.*, 1933, **58**, 137.
109. Heidelberger (M.) & Mayer (M.). — *J. Bact.*, 1940, **39**, 37.
110. Heidelberger (M.) & Pedersen (K. O.). — *J. Exptl. Med.*, 1937, **65**, 393.
111. Heidelberger (M.), Treffers (H. P.) & Mayer (M.). — *J. Exptl. Med.*, 1940, **71**, 271.
112. Hofer (E.). — *Acta Biol. Exptl.*, 1938, **12**, 70.
113. Hofmeister (F.). — *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1889, **25**, 1 et **27**, 395, et 1890, **28**, 210.
114. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — *J. Immunol.*, 1934, **26**, 469.
115. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — *J. Immunol.*, 1936, **30**, 33.
116. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — *J. Gen. Physiol.*, 1935, **19**, 373.
117. Hooker (S. B.) & Boyd (W. C.). — Voir Boyd (W. C.) [24].
118. Horsfall (F. L. Jr.) & Goodner (K.). — *J. Exptl. Med.*, 1936, **64**, 583.
119. Huggins (M. L.). — *J. Chem. Phys.*, 1940, **8**, 598.
120. Ivanovics (G.). — *Z. Immunitätsf.*, 1940, **97**, 402.
121. Jacoby (M.). — *Beit. Z. Chem. Physiol. Path.*, 1902, **1**, 51.
122. Kabat (E. A.). — *J. Exptl. Med.*, 1939, **69**, 103.
123. Kabat (E. A.) & Mayer (M.). — Experimental immunochemistry, 1 vol., Thomas, édit., Springfield, 1948.
124. Kabat (E. A.) & Pedersen (K. O.). — *Science*, 1938, **87**, 372.
125. Karush (F.) & Siegel (B. M.). — *Science*, 1948, **108**, 107.
126. Keckwick (R. A.) & Cannan (R. K.). — *Biochem. J.*, 1936, **30**, 227.
127. Kjehldahl. — Voir Loiseleur (J.). [150].
128. Kowarsky (A.). — *Deut. med. Wochschr.*, 1901, **27**, 442.
129. Kraus (R.). — XIV[e] Congrès Intern. Méd., 1907.
130. Kraus (R.). — *Wien. klin. Wochschr.*, 1897, **10**, 431 et 736.
131. Krueger (R. C.) & Heidelberger (M.). — *J. Exptl. Med.*, 1950, **92**, 383.
132. Landsteiner (K.). — *Biochem. Z.*, 1920, **104**, 280.
133. Landsteiner (K.). — The specificity of serological reactions, 1 vol., Harvard University Press, édit., Cambridge, 1945.
134. Landsteiner (K.) & Lampl (H.). — *Z. Immunitätsf.*, 1917, **26**, 258.
135. Landsteiner (K.) & Van den Scheer (J.). — *J. Exptl. Med.*, 1932, **52**, 399.
136. Landsteiner (K.) & Van den Scheer (J.). — *J. Exptl. Med.*, 1936, **63**, 325.
137. Landsteiner (K.) & Van den Scheer (J.). — *J. Exptl. Med.*, 1937, **67**, 709.
138. Landsteiner (K.) & Welecki (S.). — *Z. Immunitätsf.*, 1911, **8**, 397.

139. Lange (B.). — *Z. physik. Chem.*, 1932, **1**, 1928.
140. Langmuir (I.). — Nobel Lecture, 1932.
141. Lecomte du Noüy (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90**, 168.
142. Lecomte du Noüy (P.) & Hamon (V.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1936, **56**, 359.
143. Liebermann (L.). — *Ber. deuts. Chem. Ges.*, 1885, **185**, 1803.
144. Linderström-Lang (K.) & Schmidt (S.). — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1930, **18**, 1.
145. Loiseleur (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1935, **201**, 966.
146. Loiseleur (J.). — Immunité artificielle et structure des composés biologiques, 1 vol., Hermann & C^ie^, édit., Paris, 1942.
147. Loiseleur (J.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1942, **136**, 435.
148. Loiseleur (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, 978.
149. Loiseleur (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1946, **222**, 461.
150. Loiseleur (J.). — Techniques de laboratoire, 1 vol., Masson & C^ie^, édit., Paris, 1947.
151. Loiseleur (J.) & Lévy (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1947, **73**, 116.
152. Loiseleur (J.) & Thillard (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1943, **25**, 351.
153. Lumière (A.) & Meyer (P.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1934, **15**, 1698.
154. Mc Fadyen (D. A.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **186**, 1.
155. Mc Farlane (A. S.). — *Biochem. J.*, 1935, **29**, 1209.
156. Machebœuf (M.). — Thèse Sc., Paris, 1928.
157. Machebœuf (M.). — Rapport au VI^e^ Congrès Chim. Biol., Lyon, 1937, 1 vol., Masson & C^ie^, édit., Paris, 1937.
158. Machebœuf (M.). — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1939, **2**, 117.
159. Machebœuf (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1941, **212**, 575.
160. Machebœuf (M.). — *Schw. Z. Path. Bakt.*, 1946, **9**, 466.
161. Machebœuf (M.). — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1948, **8**, 245.
162. Machebœuf (M.). — Voir Tayeau (F.) [252], p. 45.
163. Machebœuf (M.) & Faure (M.). — *Gaz. Méd. France*, 1941, **48**, 273.
164. Machebœuf (M.) & Faure (M.). — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1942, **3**, 134.
165. Machebœuf (M.), Lacaille (P.) & Rebeyrotte (P.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29**, 402.
166. Machebœuf (M.), Tayeau (F.) & Battut (V. M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1939, **130**, 481.
167. Marcus (E.). — *Z. physiol. Chem.*, 1899, **28**, 559.
168. Marrack (J. R.). — The chemistry of antigens and antibodies, 1 vol. His Majesty's Stationnary Office, London, 1938.

169. Marrack (J. R.) & Hoch. — Voir Marrack (J. R.). — 1st Intern. Congress Biochem., Cambridge, 1949, abstr., 449.
170. Marrack (J. R.) & Smith (F. C.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 30.
171. Marrack (J. R.) & Smith (F. C.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1931, **12**, 182.
172. Mason (K. R.). — *Johns Hopkins Hosp. Bull.*, 1922, **33**, 116.
173. Mayer (M.) & Heidelberger (M.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **143**, 567.
174. Michaelis (L.) & Davidsohn (H.). — *Biochem. Z.*, 1912, **47**, 59.
175. Michaelis (L.) & Fleischmann (P.). — *Z. exptl. Path. Therap.*, 1905, **1**, 547.
176. Miessner (H.). — *Berl. Tierärztl. Wochschr.*, 1909, **25**, 634.
177. Miles (A. A.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1933, **14**, 43.
178. Mœrch (J. R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **108**, 459.
179. Morgan (W. T. J.). — *Biochem. J.*, 1937, **31**, 2003.
180. Moubasher (R.) & Othman (A. M.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **72**, 2666.
181. Nellenstein. — Voir Garner (W. E.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1926, **22**, 459.
182. Neurath (H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 1841.
183. Neuzil (E.). — Thèse Méd., Bordeaux, 1948.
184. Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 186.
185. Nicolle (C.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1898, **12**, 161.
186. Nicolle (C.) & Ducloux (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1903, **55**, 904.
187. Northrop (J. H.). — *Science*, 1941, **93**, 92.
188. Northrop (J. H.). — *J. Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 465.
189. Obermayer (F.) & Pick (E. P.). — Séance du 22 mai 1903 de la « K. K. Gesellschaft der Aertze in Wien ».
190. Obermayer (F.) & Pick (E. P.). — *Wien. klin. Wochschr.*, 1904, **17**, 265.
191. Oudin (J.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1945, **27**, 254.
192. Païc (M.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1939, **62**, 534.
193. Pappenheimer (A. M. Jr.), Lundgren (H. P.) & Williams (J. W.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1939, **61**, 533.
194. Pappenheimer (A. M. Jr.), Lundgren (H. P.) & Williams (J. W.). — *J. Exptl. Med.*, 1940, **71**, 247.
195. Pauling (L.). — The nature of the chemical bond, Cornell Univ. Press, Ithaca, 1939.
196. Pauling (L.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1950, **62**, 2640.
197. Pauling (L.). — Voir Landsteiner (K.) [133].
198. Pauling (L.). — Molecular structure and biological specificity. Conférence au XIe Congrès Intern. Chim. pure appl., London, 1947.

199. Pauling (L.) & Campbell (D. H.). — *Science*, 1942, **95**, 440.
200. Pauling (L.), Pressman (D.) & Campbell (D. H.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1944, **66**, 330.
201. Pautrizel (R.). — Thèse Sc., Bordeaux, 1948.
202. Pautrizel (R.) & Tayeau (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 221.
203. Pautrizel (R.) & Tayeau (F.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1948, **125**, 550.
204. Perutz (M.). — *Nature*, 1942, **149**, 491, et 1943, **151**, 714.
205. Petterman (M. L.) & Pappenheimer (A. M. Jr.). — *J. Phys. Chem.*, 1941, **45**, 1.
206. Pillemer (L.). — *Science*, 1946, **103**, 615.
207. Pokrowsky (G.). — *Koll. Z.*, 1929, **47**, 55.
208. Polonovski (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1936, **121**, 1103.
209. Polonovski (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 583; **120**, 28 et **121**, 1103.
210. Polonovski (M.) & Moreno Martin (F.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1935, **119**, 583.
211. Pope (C. G.) & Healey (M.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1939, **20**, 213.
212. Porges (O.) & Spiro (K.). — *Beitr. Z. Chem. Physiol. Path.*, 1903, **3**, 277.
213. Putzey (P.) & Brosteaux (T.). — *Trans. Faraday Soc.*, 1934, **31**, 1314.
214. Quinan (C.). — *Beitr. Z. Chem. Physiol. Path.*, 1904, **5**, 95.
215. Raleigh. — *Phil. Mag.*, 1871, 41.
216. Ramon (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 711.
217. Ramon (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1922, **86**, 813.
218. Ramon (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **104**, 31.
219. Ramon (G.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 539.
220. Rebeyrotte (P.) & Slizewicz (P.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130**, 257.
221. Régnier (S.). — Thèse Univ. (Pharm.), Bordeaux, 1951.
222. Reiss (P.). — Thèse Sc., Strasbourg, 1942.
223. Rothen (A.). — *J. Gen. Physiol.*, 1942, **25**, 1487.
224. Rothen (A.). — *Science*, 1945, **102**, 446.
225. Rothen (A.). — *J. Biol. Chem.*, 1947, **168**, 75.
226. Rothen (A.). — *J. Am. Chem. Soc.*, 1948, **27**, 32.
227. Royer (L.). — Thèse Sc., Paris, 1929.
228. Ruheman (S.). — *J. Chem. Soc.*, 1910, **97**, 1438 et 2025; 1911, **99**, 192 et 1486.
229. Ruheman (S.). — Voir Bertrand (J.) [15].
230. Saias (E.). — Thèse Pharm., Paris, 1942.
231. Sandor (G.) & Ceddaha (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31**, 1005.
232. Sandor (G.), Girard (G.) & Skrobisz (C.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1948, **74**, 516.

233. Sandor (G.) & Goldie (H.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **126,** 295, et 1938, **129,** 391.
234. Sandor (G.) & Skrobisz (C.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1949, **31,** 86.
235. Schmidt (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **88,** 105.
236. Schmidt (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1924, **90,** 1178.
237. Schmidt (S.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1928, **42,** 63.
238. Schmidt (S.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103,** 624.
239. Schönberg (A.), Moubasher (R.) & Mostafa (A.). — *J. Chem. Soc.*, 1948, 176.
240. Schott (H. F.), Rockland (L. B.) & Dunn (M. S.). — *J. Biol. Chem.*, 1944, **154,** 397.
241. Schramm (G.) & Friedrich-Freksa (M.). — *Z. physiol. Chem.*, 1941, **270,** 233.
242. Schulmann (H.). — 1st Intern. Congress Biochem., Cambridge, 1949.
243. Sidwick (N. V.). — The electronic theory of valency, 1 vol., Oxford University Press, London, 1927.
244. Singer (S. J.). — *J. Biol. Chem.*, 1950, **182,** 189.
245. Sobotka (H.) & Friedlander (H.). — *J. Exptl. Med.*, 1928, **47,** 57.
246. Sörensen (S. P. L.). — Voir Loiseleur (J.) [150].
247. Staub (A. M.). — 1st Intern. Congress Biochem., Cambridge, 1949, Abstr., 461.
248. Staub (A. M.). — Communication orale.
249. Strecker (A.). — *Ann. Chem. Pharm.*, 1862, **123,** 363.
250. Takenomata (L.). — *Z. Immunitätsf.*, 1924, **39,** 256.
251. Tayeau (F.). — Thèse Sc., Bordeaux, 1939.
252. Tayeau (F.). — Thèse Méd., Bordeaux, 1944.
253. Tayeau (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26,** 287.
254. Tayeau (F.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1944, **26,** 293.
255. Tayeau (F.). — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1952, **14,** 129
256. Tayeau (F.), Breton (J.) & Buffe (G. M.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1947, **29,** 671.
257. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1949, **229,** 1038.
258. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1949, **144,** 409.
259. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — 1st Intern. Congr. Biochem., Cambridge, 1949, p. 455.
260. Tayeau (F.), Faure (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *Disc. Faraday Soc.*, 1949, n° 6, 106.
261. Tayeau (F.) & Marquevielle (J.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1952, **234,** 901.
262. Tayeau (F.) & Marquevielle (J.). — IIe Congr. Intern. Biochim., Paris, 1952.

263. Tayeau (F.) & Marquevielle (J.). — *In* Tayeau (F.). — *Exp. Ann. Biochim. Méd.*, 1952, **14**, 129.
264. Tayeau (F.) & Martin (M.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1943, **137**, 503.
265. Tayeau (F.) & Neuzil (E.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1946, **140**, 509.
266. Tayeau (F.) & Neuzil (E.). — *J. Méd. Bordeaux*, 1953, **130**, 313.
267. Tayeau (F.), Neuzil (E.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1947, **141**, 191.
268. Tayeau (F.) & Pautrizel (R.). — *C. R. Soc. Biol.*, 1948, **142**, 223.
269. Tayeau (F.), Pautrizel (R.) & Léglise (F.). — II[e] Congr. Intern. Biochim., Paris, 1952.
270. Tayeau (F.) & Régnier (S.). — *Bull. Soc. Pharm., Bordeaux*, 1953, à paraître.
271. Tayeau (F.) & Rolland (R.). — Résultats non publiés.
272. Taylor (G. L.). — *J. Hyg.*, 1931, **31**, 56.
273. Taylor (G. L.). — *J. Hyg.*, 1933, **33**, 12.
274. Taylor (G. L.), Adair (G. S.) & Adair (M. E.). — *J. Hyg.*, 1932, **32**, 340.
275. Taylor (G. L.), Adair (G. S.) & Adair (M. E.). — *J. Hyg.*, 1934, **34**, 118.
276. Tchistovitch (T. H.). — *Ann. Inst. Pasteur*, 1899, **13**, 406.
277. Teague (O.) & Field (C. V.). — *J. Exptl. Med.*, 1907, **9**, 86.
278. Teorell (T.). — *Nature*, 1943, **151**, 696.
279. Teorell (T.). — *J. Hyg.*, 1946, **44**, 227.
280. Tiselius (A.) & Kabat (E. A.). — *Science*, 1938, **87**, 416.
281. Tiselius (A.) & Kabat (E. A.). — *J. Exptl. Med.*, 1939, **69**, 119.
282. Tizner (E.). — *Mikrochem.*, 1940, **28**, 141.
283. Topley (W. W. C.), Wilson (J.) & Duncan (J. T.). — *Brit. J. Exptl. Path.*, 1935, **16**, 116.
284. Uhlenhuth (P.). — *Deut. med. Wochschr.*, 1903, **29**, 39.
285. Uhlenhuth (P.). — Voir Bordet (J.) [20].
286. Van Slyke (D. D.). — *J. Biol. Chem.*, 1911, **4**, 3.
287. Van Slyke (D. D.) & Dillon (R. T.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, 1936, **34**, 362.
288. Van Slyke (D. D.) & Dillon (R. T.). — *C. R. Lab. Carlsberg*, 1938, **22**, 480.
289. Verwey (W. F.). — *J. Exptl. Med.*, 1940, **71**, 635.
290. Virtanem (A.) & Laine (T.). — *Nature*, 1938, **142**, 734.
291. Virtanem (A.) & Rautanem (N.). — *Biochem. J.*, 1947, **41**, 101.
292. Viscontini (M.). — *C. R. Acad. Sc.*, 1944, **219**, 222.
293. Wells & Osborne. — Voir Bordet (J.) [20].

294. West (E. S.) & Rinehart (R. E.). — *J. Biol. Chem.*, 1942, **146**, 105.
295. Wiener (A. S.). — *J. Am. Clin. Path.*, 1945, **15**, 106.
296. Wu (H.), Sab (P. P. T.) & Li (C. P.). — *Proc. Soc. Exptl. Biol.*, 1929, **26**, 737.
297. Wurmser (R.). — *Pubb. Stuz. Zool. Napoli.*, 1949, **21**, suppl. 22.
298. Wurmser (R.) & Filliti-Wurmser (S.). — *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, **4**, 238.
299. Zinsser (H.), Endors (J. F.) & Fothergill (L. D.). — Immunity principles and application in medicine and public health, 1 vol., Mac Millan & C°, New-York, 1939.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 1

PREMIÈRE PARTIE

Les antigènes et les anticorps.
Notions fondamentales.
La réaction de précipitation spécifique.
Etude théorique.

CHAPITRE PREMIER. — LES ANTIGÈNES ET LES ANTICORPS 5

I. — Les antigènes 6
a) Haptènes naturels 7
b) Antigènes non protéidiques 8
II. — Les anticorps 8
III. — La réaction antigène-anticorps 9

CHAPITRE II. — HISTORIQUE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS 11

CHAPITRE III. — LA PREMIÈRE PHASE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS 13

I. — Forces intermoléculaires fortes 13
II. — Forces intermoléculaires faibles 15
III. — Energie de formation du complexe antigène-anticorps 16
IV. — Dissociation du complexe antigène-anticorps 17
V. — Vitesse de combinaison antigène-anticorps 18

CHAPITRE IV. — LA DEUXIÈME PHASE DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE-ANTICORPS 20

I. — Phénomène de zone 21
a) Aspect du phénomène 21
b) Comparaison des procédés α et β 23
c) Union de l'antigène et de l'anticorps en proportions variables 23
d) Réversibilité de la réaction de précipitation 24

Pages

II. — La vitesse de précipitation 24
a) Application de la vitesse de précipitation à l'étude du phénomène de zone 24
1° Procédé α 25
2° Procédé β 26
3° Etude comparative 26
b) Facteurs divers influençant la vitesse de précipitation 26

CHAPITRE V. — SUR LA NOTION D'AVIDITÉ DES IMMUNSÉRUMS. 29
Hétérogénéité des anticorps 30

CHAPITRE VI. — MÉCANISME DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE. THÉORIES DE LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION ANTIGÈNE - ANTICORPS 32
I. — Anciennes théories 34
II. — Théories modernes 35
a) Théorie de Marrack 35
b) Théorie de Heidelberger 37
c) Théorie de Dervichian et Grabar 38
d) Théorie de Pauling 39
e) Théorie de la monovalence des anticorps. 40

CHAPITRE VII. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES PROTIDES. 41

DEUXIÈME PARTIE

Recherches expérimentales. Action de la ninhydrine sur les immunsérums précipitants.

CHAPITRE PREMIER. — NINHYDRINE ET TEMPS DE FLOCULATION. ACTION SUR LE SÉRUM DE LAPIN 48
I. — Essais préliminaires 48
II. — Action de la ninhydrine sur la vitesse de floculation du système sérum de Cheval-antisérum de Lapin 50
III. — Spécificité du phénomène 50
IV. — Essais sur divers sérums de Lapin anti-Cheval. 51
V. — Ninhydrine et titre en anticorps des immunsérums précipitants 53
VI. — Etude de la zone de floculation des immunsérums traités par la ninhydrine 54
VII. — Action de la ninhydrine et loi des proportions optima 58
VIII. — Action de la ninhydrine sur l'antigène 59

Pages

IX. — Rôle éventuel joué par le pigment bleu dans l'accélération du pouvoir floculant des immunsérums de Lapin 60
X. — Rôle des acides aminés libres des immunsérums. 61
XI. — Extension du phénomène à divers immunsérums de Lapin 61

Conclusions du premier chapitre 64

CHAPITRE II. — NINHYDRINE ET TEMPS DE FLOCULATION. ACTION SUR LE SÉRUM DE CHEVAL 65

I. — Essais préliminaires 65
II. — Action de la ninhydrine sur la vitesse de floculation du système sérum de Cheval antidiphtérique-toxine diphtérique 66
III. — Spécificité du phénomène 66
IV. — Essais sur divers sérums antidiphtériques de Cheval 68
V. — Ninhydrine et titre en anticorps des immunsérums précipitants 68
VI. — Etude de la zone de floculation des immunsérums traités par la ninhydrine 69
VII. — Action de la ninhydrine et loi des proportions optima 70
VIII. — Action de la ninhydrine sur l'antigène 72
IX. — Rôle éventuel joué par le pigment bleu dans le pouvoir floculant des immunsérums de Cheval.. 73
X. — Rôle des acides aminés libres des immunsérums. 73
XI. — Extension du phénomène à divers immunsérums de Cheval 73
XII. — Composition du précipité spécifique après traitement de l'immunsérum par la ninhydrine 75

Conclusions du second chapitre 77

CHAPITRE III. — ETUDE DE QUELQUES PARAMÈTRES INFLUENÇANT L'ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN ET DE CHEVAL 78

I. — Immunsérum de Lapin 78
a) Influence de la concentration en ninhydrine. 78
b) Influence du temps de contact entre l'immunsérum et la ninhydrine 80
c) Influence de la dilution du milieu 82
d) Influence du *p*H d'action de la ninhydrine. 83

Pages

II. — Immunsérum de Cheval 87
a) Influence de la concentration en ninhydrine. 87
b) Influence du temps de contact entre l'immunsérum et la ninhydrine 89
c) Influence de la dilution du milieu 91
d) Influence du *p*H d'action de la ninhydrine. 91
Conclusions du chapitre III 93

CHAPITRE IV. — INTERPRÉTATION DES PHÉNOMÈNES OBSERVÉS : RÔLE ÉVENTUEL DE LA SOLUBILITÉ DES ANTICORPS MIS EN JEU. 95

I. — Etude de la solubilité des protéines sériques « ninhydrinisées » 96
a) Solubilité des protéines sériques traitées ou non par la ninhydrine dans les solutions de sulfate d'ammonium 96
1° Sérum de Lapin 97
2° Sérum de Cheval 99
b) Fractions protéidiques des sérums traités par des quantités variées de ninhydrine. 101
1° Sérum de Lapin 101
2° Sérum de Cheval 103
c) Fractions protéidiques des sérums traités par la ninhydrine pendant des temps variés 105
1° Sérum de Lapin 105
2° Sérum de Cheval 106
Remarque 108
1° Sérum de Lapin 108
2° Sérum de Cheval 109
d) Action précipitante exercée par la ninhydrine sur les fractions protéidiques sériques 111
II. — Vérification immunologique de l'hypothèse précédente 114
a) Sérum de Lapin 114
b) Sérum de Cheval 116
c) Ninhydrine et système polyholoside du charbon - antisérum de Mulet 117
Conclusions du chapitre IV 117

CHAPITRE V. — HYPOTHÈSE SUR LE « BLOCAGE » DES GROUPEMENTS IONISÉS DES PROTÉINES DU LAPIN ET DU CHEVAL 119

I. — Etude comparative du blocage des fonctions amine par la ninhydrine sur les sérums de Lapin et de Cheval 121

Pages

II. — Etude électrophorétique des protéines de Lapin et de Cheval traitées par la ninhydrine 126

Conclusions du chapitre V 127

CHAPITRE VI. — RÔLE ÉVENTUEL DE DIVERSES PROPRIÉTÉS PHYSICOCHIMIQUES 129

I. — Rôle joué par la fonction aldéhyde éventuellement créée 129

II. — Ninhydrine et poids moléculaire des anticorps. 130

III. — Pouvoir rotatoire des sérums de Cheval et de Lapin 133

Conclusions du chapitre VI 133

CHAPITRE VII. — HYPOTHÈSE METTANT EN JEU L'AVIDITÉ DES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN ET DE CHEVAL TRAITÉS PAR LA NINHYDRINE 134

I. — Essais sur l'immunsérum de Lapin 136

II. — Essais sur l'immunsérum de Cheval 139

Conclusions du chapitre VII 143

TROISIÈME PARTIE

Recherches expérimentales.
Ninhydrine et sérums délipidés.

CHAPITRE PREMIER. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS DE LAPIN DÉLIPIDÉS 147

I. — Lipides et réaction de précipitation spécifique. 147

II. — Ninhydrine et immunsérums de Lapin délipidés. 149

III. — Généralisation du phénomène à divers immunsérums de Lapin 151

Conclusions du chapitre premier 153

CHAPITRE II. — ACTION DE LA NINHYDRINE SUR LES IMMUNSÉRUMS DE CHEVAL DÉLIPIDÉS 154

Conclusions du chapitre II 155

CHAPITRE III. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS 156

Conclusions du chapitre III 159

CONCLUSIONS GÉNÉRALES 161

BIBLIOGRAPHIE 165

Bordeaux. — Imp. E. DROUILLARD, place de la Victoire, 3.

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ :

NOTIONS ACTUELLES SUR LA STRUCTURE ET LA SYNTHÈSE DES PÉNICILLINES

Vu :
Bordeaux, le 1er Avril 1953,
Le Doyen,
G. BRUS.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux, le 2 Avril 1953,
Le Recteur de l'Académie,
E. DELAGE.